

**SONIA MARA RABONI**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HANTAVÍRUS  
ESTUDOS FILOGENÉTICOS E GERAÇÃO DE INSUMOS  
PARA O DIAGNÓSTICO E PREVENÇÃO DA HANTAVIROSE**

**Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do título de Doutor em Ciências,  
ao Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Molecular, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.**

**Orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Nunes Duarte dos Santos**

**CURITIBA**

**2006**

*A Alfredo, companheiro de todos os  
momentos, com todo o meu amor, e minhas  
filhas Carolina e Marina, razão de minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

*Nenhum homem é uma ilha isolada.  
Cada homem é uma parte do continente,  
uma parte da terra.*

John Donne

Durante a realização desta tese contei com o apoio de muitos amigos e familiares, suas palavras de apoio sempre me incentivaram a continuar em frente, por isso agradeço a todos aqueles que estiveram presentes na elaboração deste trabalho, em especial:

- Minha orientadora, **Dr.<sup>a</sup> Cláudia Nunes Duarte dos Santos**, pelo apoio, estímulo, amizade e dedicação dispensada na orientação deste trabalho. Reconheço que aceitar um aluno tempo parcial para realizar um trabalho que exige tanta dedicação pode comprometer toda uma pesquisa; obrigada pela confiança depositada em mim e por acreditar que isso seria possível.
- Minha **família**, exemplo de esforço, amor e amizade, que sempre me inspirou e me apoiou em minha jornada.
- Meus colegas de trabalho, **Meri, Luine, Clyete, Márcia, Gisa, Luciane, Maria do Carmo e Sérgio**, que muitas vezes realizaram minhas atividades para que eu pudesse me dedicar à tese. Nesta jornada longa que temos caminhado juntos para a *construção* do laboratório de virologia do Hospital de Clínicas, tive o prazer de ensinar e aprender com vocês, sendo que a maior lição que vocês me passaram é a do companheirismo; certamente o apoio irrestrito de vocês tem sido um estímulo a continuar neste meu trabalho.
- Aos meus colegas do IBMP, **Aurélío, Luana, Mário, Ana Luiza, Juliano, Deyse, Vanessa e Marina**, que participaram em todas as fases da realização deste trabalho; a busca constante do aprendizado em nosso grupo foram estímulos que espero levar em minhas atividades por toda a minha caminhada.
- Aos funcionários da Secretaria Estadual de Saúde: **Gisélia**, divisão de zoonoses, por sua participação ativa na busca do conhecimento e controle desta doença em todo o Estado, sua paciência nas inúmeras vezes em que a procurei para avaliar todas as notificações desta doença, por sua organização e investigação criteriosa de todos os dados clínico-epidemiológicos da hantavirose no Paraná. Bioquímica **Irene**, LACEN-PR, pelo fornecimento das

amostras clínicas estudadas e, enfermeira **Dione**, 6.<sup>a</sup> Regional de Saúde, pela participação voluntária na coleta de dados clínicos e amostras de soros dos pacientes e participantes do estudo de soro prevalência. Certamente o envolvimento incondicional destas pessoas no estudo da hantavirose tem contribuído diretamente para o conhecimento e controle desta patologia no Estado do Paraná.

- Ao **Dr. Juan Arbiza**, Laboratório de Virologia Molecular, Universidad de la Republica, Uruguai, por seu apoio desde o início deste trabalho e pela organização da RIVE (Red de Virosis Emergentes), que permitiu contatos com institutos de pesquisa de países da América Latina, que muito têm contribuído com a troca de informações sobre a dinâmica da infecção por hantavírus na América do Sul.
- Aos pesquisadores participantes da RIVE (Red de Virosis Emergentes), **Dr.<sup>a</sup> Silvana Levis**, Argentina, **Dr.<sup>a</sup> Maritza Navarrete**, Chile, e **Adriana Delfraro**, Uruguai, por sua calorosa recepção em seus laboratórios e pelo fornecimento dos soros que permitiram realizar uma expansão da validação do kit desenvolvido aos países da América do Sul. Em especial, Dr.<sup>a</sup> Silvana Levis por suas sugestões nas fases finais de análise de resultados.
- Aos funcionários de BioManguinhos, **Edmilson** e **Antonio Carlos**, por suas valiosas sugestões na fase inicial de padronização do teste diagnóstico sorológico.
- Meu especial agradecimento a todas as pessoas que colaboraram como sujeitos da pesquisa.

*Guardar uma coisa não é escondê-la ou  
trancá-la.  
Em um cofre não se guarda coisa alguma.  
Em cofre perde-se a coisa à vista.*

*Guardar uma coisa é olhá-la, fitá-la,  
mirá-la por  
admirá-la, isto é, iluminá-la ou ser por ela  
iluminado.*

*Guardar uma coisa é vigiá-la, isto é, fazer  
vigília por ela, isto é, velar por ela, isto é,  
estar acordado por ela,  
isto é, estar por ela ou ser por ela.*

*Por isso melhor se guarda o vôo de um  
pássaro  
Do que um pássaro sem vôos.*

*Por isso se escreve, por isso se diz,  
por isso se publica,  
por isso se declara e declama um poema:  
Para guardá-lo:  
Para que ele, por sua vez, guarde o que  
guarda:  
Guarde o que quer que guarda um poema:  
Por isso o lance do poema:  
Por guardar-se o que se quer guardar.*

Antonio Cícero

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE SIGLAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1.1 História.....	1
1.1.1.1 Febre hemorrágica com síndrome renal .....	1
1.1.1.2 Síndrome cardiopulmonar por hantavírus .....	2
1.1.2 Virologia .....	3
1.1.2.1 Classificação, morfologia e componentes estruturais.....	3
1.1.2.2 Replicação viral .....	8
1.1.2.3 Filogenia .....	11
1.1.2.4 Variabilidade genética e evolução molecular .....	13
1.1.3 Epidemiologia.....	15
1.1.3.1 Hantavirose no Brasil.....	19
1.1.3.2 Soroprevalência.....	21
1.1.4 Patogenia e Patologia .....	23
1.1.4.1 Roedores .....	23
1.1.4.2 Humanos .....	24
1.1.4.3 Achados anátomo-patológicos.....	26
1.1.5 Doença.....	27
1.1.5.1 Febre hemorrágica com síndrome renal .....	27
1.1.5.2 Síndrome cardiopulmonar por hantavírus .....	28
1.1.6 Diagnóstico .....	31
1.1.7 Tratamento e Prevenção .....	36
1.2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....	39

<b>2</b>	<b>DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>41</b>
2.1	Estudo clínico epidemiológico e padronização de teste molecular específico.....	41
2.2	Hantavírus na américa do sul: análise filogenética do segmento s de casos de scph no paraná, brasil.....	43
2.2 2.3	Hantaviroses no brasil: desenvolvimento e avaliação de um ensaio imunoenzimático e <i>immunoblotting</i> baseado em antígeno recombinante ....	46
<b>3</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>101</b>
<b>5</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>102</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>103</b>

## LISTA DE TABELAS

1	GENÓTIPOS DE HANTAVÍRUS CONHECIDOS ATÉ 2006 .....	18
2	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DISTINTAS ENTRE FHSR E SCPH .....	28

## LISTA DE FIGURAS

1	DISTRIBUIÇÃO APROXIMADA DOS GENÓTIPOS DE HANTAVÍRUS E ROEDOR-RESERVATÓRIO DESCRITOS NO NOVO MUNDO .....	3
2	ESTRUTURAS GENÔMICAS E ESTRATÉGIAS CODIFICADORAS DOS HANTAVÍRUS, FAMÍLIA <i>BUNYAVIRIDAE</i> .....	5
3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DO VIRUS SIN NOMBRE .....	5
4	REPLICAÇÃO VIRAL: VÍRUS DA FAMÍLIA <i>BUNYAVIRIDAE</i> .....	10
5	TRANSCRIÇÃO E REPLICAÇÃO DO RNA (FAMÍLIA <i>BUNYAVIRIDAE</i> , GÊNERO <i>HANTAVIRUS</i> ) .....	11
6	DISTRIBUIÇÃO APROXIMADA DOS HANTAVÍRUS E FEBRE HEMORRÁGICA COM SÍNDROME RENAL (FHSR) NO VELHO MUNDO .....	17
7	PROVÁVEIS RESERVATÓRIOS E VARIANTES VIRAIS IDENTIFICADOS NO BRASIL, 1993-2006 .....	20
8	PROGRESSÃO CLÍNICA DA SÍNDROME CARDIOPULMONAR POR HANTAVÍRUS .....	31



## LISTA DE SIGLAS

$\gamma$ -INF	- $\gamma$ -interferon
aa	- Aminoácidos
ANAJV	- Vírus Anajatuba
ANDV	- Vírus Andes
ARAV	- Vírus Araraquara
BAYV	- Vírus Bayou
BCCV	- Vírus Black Creek Canal
CASV	- Vírus Castelo dos Sonhos
células VERO E6	- Linhagem de células de rim de macaco verde africano, clone E6.
CITV	- Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
CMV	- Citomegalovírus
DNA	- Ácido desoxirribonuclêico
DOBV	- Vírus Dobrava
EBV	- Vírus Epstein Barr
EIE	- Ensaio imunoenzimático
FHSR	- Febre hemorrágica com síndrome renal
GPP	- Glicoproteína precursora
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
HLA	- Antígeno de histocompatibilidade
HTNV	- Vírus Hantaan
JUQV	- Vírus Juquitiba
KDa	- Kilodáltons
LNv	- Vírus Laguna Negra
MHC	- Complexo de Histocompatibilidade Maior
NB3	- Segurança biológica nível 3
NCR	- Regiões não codificadoras
NO	- Óxido nítrico
NYV	- Vírus New York
ORF	- <i>Open read frame</i>
ORNV	- Vírus Orán
PHV	- Vírus Prospect Hill
PNRT	- Testes de redução-neutralização em placas
PUUV	- Vírus Puumala
qPCR	- PCR quantitativo
RFLP	- Polimorfismo dos fragmentos digeridos por enzima de restrição
RMV	- Vírus Rio Mamoré

RNA	- Ácido ribonuclêico
RNA <sub>m</sub>	- Ácido ribonuclêico mensageiro
RT-PCR	- Reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa
SCPH	- Síndrome Cardiopulmonar causada por Hantavírus
SEOV	- Vírus Seoul
SNV	- Vírus Sin Nombre
SPH	- Síndrome pulmonar causada por hantavírus
TNF	- Fator de necrose tumoral
TUV	- Vírus Tula

## RESUMO

Síndrome cardiopulmonar por hantavírus (SCPH) é uma doença emergente global causada por distintos genótipos de hantavírus. SCPH é uma doença imune severa associada com uma alta taxa de mortalidade. O objetivo deste estudo é descrever a epidemiologia, os fatores clínicos e os parâmetros laboratoriais durante o curso da SCPH em pacientes do Estado do Paraná (Brasil). Além disso, realizar a caracterização molecular dos hantavírus para análises filogenéticas e o desenvolvimento de métodos diagnósticos baseados em oligonucleotídeos e antígenos recombinantes específicos a partir de vírus obtidos de amostras clínicas desta região. Registros de todos os casos (de setembro de 1998 a janeiro de 2004) foram analisados retrospectivamente. SCPH foi confirmada em 98 pacientes, com uma taxa de mortalidade de 39%. Os sintomas mais comuns foram: febre, cefaléia, tosse e mialgia. As principais anormalidades laboratoriais encontradas foram trombocitopenia e hemoconcentração. Observou-se uma associação dos casos clínicos com trabalhadores em áreas de reflorestamento de pinus (*Pinus elliottii*) no sudoeste do Paraná. Para a caracterização molecular, o RNA viral foi extraído de amostras de sangue de pacientes com suspeita de SCPH, fornecidos pelo LACEN-PR. O *nested* RT-PCR padronizado que utiliza oligonucleotídeos específicos para o genótipo brasileiro foi realizado em todas as amostras de pacientes com SCPH. Realizou-se em seguida o seqüenciamento completo do segmento S dos hantavírus detectados em 12 pacientes com SCPH utilizando o método *priming-walking*. Todas as proteínas N dos hantavírus do Paraná foram idênticas, exceto por uma substituição de aminoácido. As análises filogenéticas deste segmento indicaram que este vírus, chamado Araucária, forma um grupo distinto de outros hantavírus circulantes na América do Sul e do Norte. Os vírus associados aos roedores *Oligoryzomys nigripes* ITA37 e ITA38 do Paraguai posicionam-se no mesmo grupo que os vírus do Paraná. Baseado na seqüência do segmento S do vírus Araucária produziu-se um antígeno recombinante rNΔ<sub>85</sub> em um sistema procariótico, que foi utilizado para a padronização de um teste diagnóstico para detecção de anticorpos IgM e IgG anti-hantavírus por ensaio imunoenzimático (EIE). Testou-se um total de 613 soros (570 humanos e 43 roedores). Encontrou-se 94,1% de sensibilidade e 99,1% de especificidade para EIE IgM, com valores preditivos positivos e negativos de 88,8% e 99,5%, respectivamente. EIE IgG teve uma sensibilidade de 95,2% e especificidade de 98,4%, com valores preditivos positivos e negativos de 91% e 99,2%, respectivamente. Além disso, observou-se uma maior positividade no diagnóstico molecular de hantavírus com o uso de oligonucleotídeos específicos. Recentemente, o kit “IBMP EIE IgM and IgG Hantec” foi incluído com ensaio diagnóstico de rotina para a detecção da infecção por hantavírus em todos os Centros de Referência do Brasil. Os resultados obtidos com este estudo contribuirão para uma maior compreensão da distribuição e manutenção do hantavírus na natureza e para melhorar os programas de Atenção à Saúde. A disponibilidade de insumos regionais permitirá maior rapidez no diagnóstico da SCPH, contribuindo para a instituição de medidas terapêuticas e a redução na taxa de mortalidade.

## ABSTRACT

Hantavirus cardiopulmonary syndrome (HCPS) is a worldwide emerging disease caused by an increasing number of distinct hantavirus genotypes. HCPS is a severe immune disease, associated with a high mortality rate. The aim of this study is to describe epidemiologic, clinical features and laboratory parameters throughout the course of HCPS patients from Paraná state (Brazil). Moreover, to perform a molecular characterization of hantavirus for phylogenetic analyses and development of diagnosis methods based on region specific primers and recombinant antigens. Records of all suspect cases (from September 1998 to January 2004) were retrospectively analyzed. Ninety-eight patients were confirmed as HCPS, with a fatality rate of 39%. The most common symptoms were fever, headache, cough and myalgia. The main laboratorial abnormalities found were thrombocytopenia and elevated hematocrit. There was a relationship of clinical cases with workers in pine tree reforestation areas in the southeastern of Paraná. For the molecular characterization, viral RNA was extracted from human samples of HCPS suspected patients, provided by LACEN-PR. The standardized nRT/PCR using Brazilian strain-specific primers was then performed in all samples from HCPS patients. The complete S segment sequences of hantaviruses isolated from 12 HCPS patients was performed using priming-walking method. All the Paraná hantavirus N proteins were identical, except for one amino acid substitution. The phylogenetic analyses of this segment indicated that these viruses, named Araucária group, form a distinct clade from those circulating in South and North American. The *Oligoryzomys nigripes*-associated viruses ITA37 and ITA38 from Paraguay were found to belong to the same clade as the Paraná viruses. Based on the S-segment sequences of Araucaria viruses a recombinant antigen (rN<sub>Δ85</sub>) was produced in a prokaryotic system, that was used to standardize a diagnostic assay to detect IgM and IgG antibodies against hantavirus by indirect enzyme immunoassay (EIA). A total of 613 (570 human and 43 rodent) sera samples were assayed. We found a 94.1% sensitivity and 99.1% specificity for IgM EIA, with positive and negative predictive values of 88.8% and 99.5%, respectively. IgG EIA had a sensitivity of 95.2% and a specificity of 98.4%, positive and negative predictive value of 91% and 99.2%, respectively. In addition, the use of specific primers for molecular diagnostic test based on nRT/PCR for the detection of hantaviruses circulating in this area yielded a higher degree of positivity. Recently, the “IBMP EIE IgM and IgG Hantec” test has been included as a routine diagnostic assay for hantavirus infection detection in all Brazilian reference centers. Taking together the results obtained from this study will contribute to a better comprehension of the distribution and maintenance of hantavirus in nature and will improve the local healthcare programs. Progress in diagnostic capacities should avoid the risk of overlooking HCPS infections, thus supporting therapeutic measures and consequently helping to reduce the mortality rate.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 REVISÃO DA LITERATURA

#### 1.1.1 História

##### 1.1.1.1 Febre hemorrágica com síndrome renal

A febre hemorrágica com síndrome renal (FHSR) inclui um grupo de doenças previamente denominadas febre hemorrágica coreana, febre hemorrágica epidêmica e nefropatia epidêmica, que foram descritas há séculos. Estudos realizados no início da década de 1940 já citavam a provável etiologia viral e sua associação com roedores silvestres (GAJDUSSEK, 1962). No entanto, esta patologia somente despertou a atenção de pesquisadores do ocidente durante a guerra da Coreia (1951-1953), quando houve um grande acometimento de soldados de tropas americanas por um quadro súbito de doença febril aguda, associada com disfunção de múltiplos órgãos e uma taxa de mortalidade de 5% a 10% (SMADEL, 1953; EARLE, 1954). Apesar de todos os estudos prévios, somente em 1976 a etiologia viral desta patologia foi confirmada e o roedor reservatório deste vírus identificado, mediante a descrição de resultados em que soros de pacientes reagiam com um antígeno específico presente nos pulmões de uma espécie de roedor silvestre capturado na Coreia, da qual subsequente, em 1978, obtiveram o isolamento e a caracterização deste novo vírus. Este agente protótipo foi chamado Hantaan (HTNV), pois o roedor foi encontrado às margens do rio deste mesmo nome que corre próximo ao paralelo 38.º entre a Coreia do Norte e do Sul (LEE, H., LEE, P. e JOHNSON, 1978; FRENCH et al., 1981). Posteriormente é que se tornou claro que uma variante europeia da mesma doença tinha provavelmente acometido milhares de soldados das tropas alemãs durante a Segunda Guerra Mundial na Finlândia (1943). Uma epidemia similar foi descrita durante a Primeira Guerra Mundial em soldados franceses, ingleses e alemães, tendo sido chamada de “nefrite de guerra” (1916) (GAJDUSSEK, 1962).

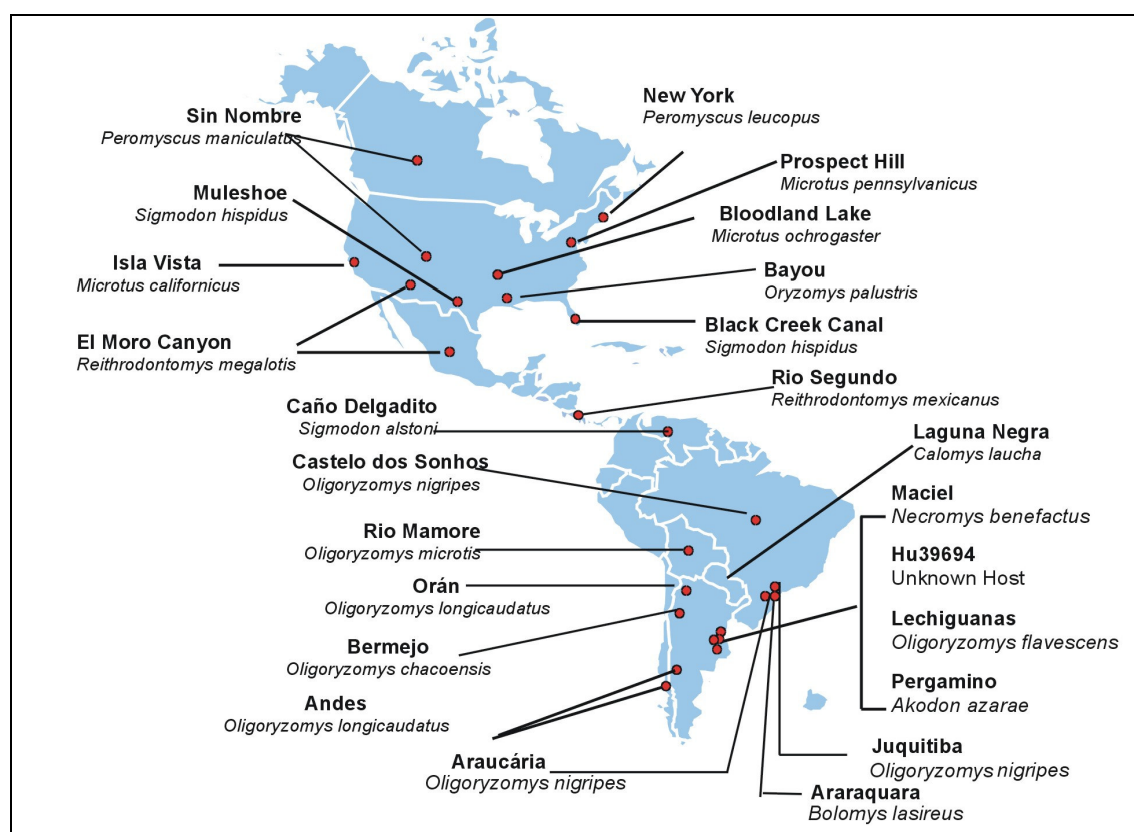
O primeiro isolamento viral de um caso humano foi realizado na Europa, a partir da urina de um soldado grego que se infectou durante manobras em Porogia (Grécia), e se obteve um sorotipo similar ao HTNV que havia sido isolado a partir de roedor (ANTONIADIS, LeDUC e DANIEL-ALEXIOU, 1987).

#### 1.1.1.2 Síndrome cardiopulmonar por hantavírus

Em maio de 1993 um surto de doença respiratória foi relatado no sudoeste dos EUA, caracterizando-se por apresentar uma fase prodrômica com sintomas inespecíficos de uma doença infecciosa, que evoluía rapidamente para edema pulmonar e insuficiência respiratória, e apresentava uma alta taxa de mortalidade (HANTAVIRUS, 1993). Inicialmente, testes laboratoriais não revelaram a etiologia desses casos, até que estudos sorológicos realizados com amostras desses pacientes demonstraram a presença de anticorpos do tipo imunoglobulina G e M anti-hantavírus. Esta era uma manifestação clínica desconhecida relacionada a estes vírus e que também ainda não havia sido descrita no continente americano. Análises subsequêntes, utilizando técnicas de biologia molecular, em exemplares de roedores *Peromyscus maniculatus*, capturados próximos às residências de pacientes infectados, demonstraram a presença de material genético viral nesses animais, confirmando assim a presença de um vírus, que foi caracterizado como um novo membro do gênero hantavírus (NICHOL et al., 1993). Tal achado permitiu uma correlação direta entre a infecção humana e o roedor infectado (reservatório), e este novo agente foi denominado inicialmente vírus *Four Corners* e posteriormente *Muerto Canyon* (HJELLE et al., 1994a; HJELLE et al., 1994b), pois historicamente os hantavírus recebem seu nome baseado em sua distribuição geográfica ou do local onde foi primeiro descrito, porém, por objeções da população residente nessa região e com o apoio de pesquisadores, o nome foi mudado para vírus Sin Nombre (SNV) (ZAKI et al., 1995). As descrições posteriores do quadro clínico, epidemiologia (em humanos e roedores), patogênese e virologia deste agente infeccioso reforçaram a conclusão que esta síndrome seria uma nova febre

hemorrágica viral americana e foi chamada de síndrome pulmonar causada por hantavírus (SPH) (HJELLE et al., 1994a). Posteriormente, devido às evidências do comprometimento direto do coração por este vírus o nome foi substituído por Síndrome Cardiopulmonar causada por Hantavírus (SCPH) (PETERS, SIMPSON e LEVY, 1999). Após os relatos iniciais desta patologia, diversos novos vírus têm sido caracterizados e descritos associados a esta síndrome em diversos países do continente americano (figura 1).

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO APROXIMADA DOS GENÓTIPOS DE HANTAVÍRUS E ROEDOR-RESERVATÓRIO DESCRITOS NO NOVO MUNDO



FONTE: [www.cdc.gov/.../hanta/hps/noframes/hpsem.htm](http://www.cdc.gov/.../hanta/hps/noframes/hpsem.htm) (modificado)

Negrito: nome do genótipo viral. Itálico: espécie de roedor-reservatório.

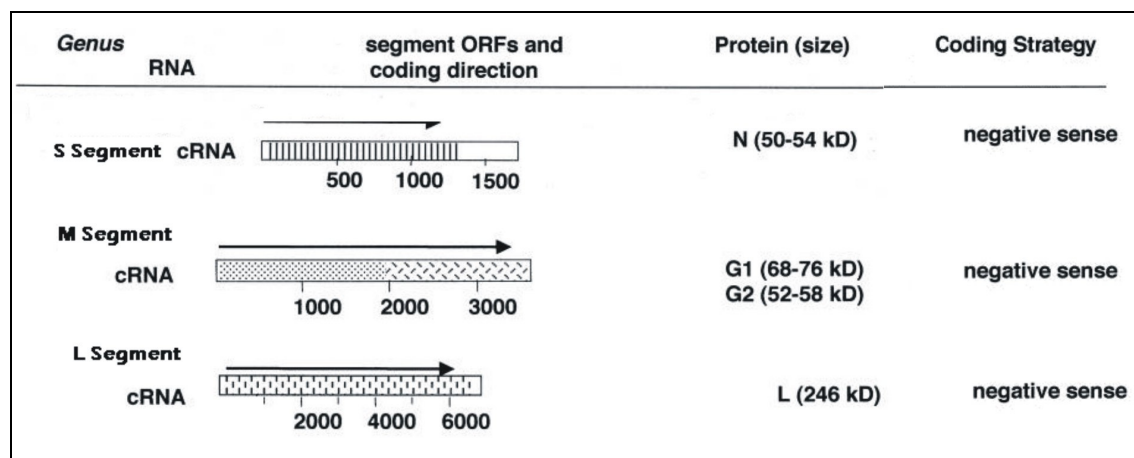
## 1.1.2 Virologia

### 1.1.2.1 Classificação, morfologia e componentes estruturais

A família *Bunyaviridae* compreende mais de 300 vírus sorologicamente distintos divididos em cinco gêneros, incluindo o gênero *Hantavírus* (SCHMALJOHN et al., 1985). Estes vírus são os únicos patógenos desta família que não são transmitidos por artrópodes; seu reservatório são roedores silvestres (robovírus). Os membros desta família são sorológica e filogeneticamente relacionados e, dependendo das manifestações clínicas, distribuição epidemiológica e diversidade genética, podem ser subdivididos em vários genótipos (SCHMALJOHN e PATTERSON, 1991; SCHMALJOHN e HJELLE, 1997). Os hantavírus têm um tamanho entre 90 a 120nm, possuem envelope e um genoma RNA tri-segmentado, de fita simples e polaridade negativa. O segmento maior, *Large* (L), varia entre 6,5 a 6,6kb e codifica a enzima RNA polimerase dependente de RNA (~250kDa). O segmento médio (M), com peso molecular variando de 5,6 a 3,7kb, codifica as duas glicoproteínas de superfície G1 (~70kDa) e G2 (~50kDa) e, o segmento menor, *Small* (S), varia de 1,7 a 2,1kb e codifica a proteína do nucleocapsídeo N (~50kDa), que forma o nucleocapsídeo helicoidal filamentoso (figura 2) (SCHMALJOHN e PATTERSON, 1991; HART e BENNETT, 1999). Estudos de microscopia eletrônica de células infectadas por hantavírus revelam partículas esféricas ou ovóides e, mais raramente, partículas alongadas de 170nm de diâmetro (HEWLETT, PETTERSSON e BALTIMORE, 1977; LEDNICK, 2003) (figura 3).



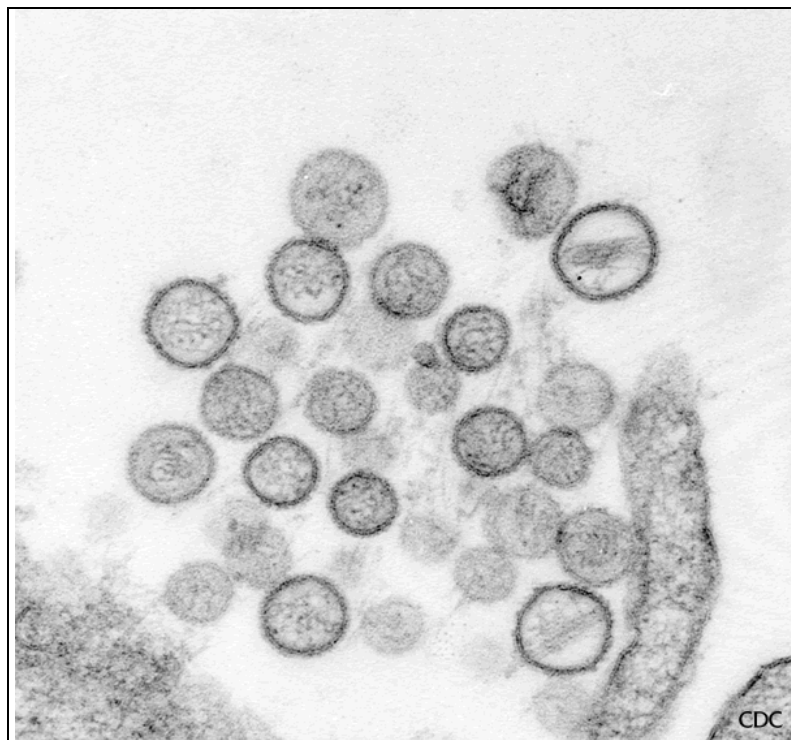
FIGURA 2 - ESTRUTURAS GENÔMICAS E ESTRATÉGIAS CODIFICADORAS DOS HANTAVÍRUS, FAMÍLIA *BUNYAVIRIDAE*



FONTE: Nichol (2001)

NOTA: O genoma consiste de três segmentos (S, M e L) de RNA fita simples, senso negativo. Números de nucleotídeos aproximados para os segmentos S, L e M são listados abaixo das caixas, os quais representam tamanhos relativos dos segmentos gênicos e mostram as regiões codificadoras da proteína viral. Segmento S - RNA senso negativo codifica a expressão de uma proteína N. Segmento M - RNA senso negativo codifica a expressão de uma poliproteína precursora, que sofre uma clivagem co-traducional formando duas glicoproteínas, G1 e G2, a partir de uma única ORF do cRNA. Segmento L - RNA senso negativo codifica a expressão da proteína L, que é uma RNA polimerase dependente de RNA, a partir de uma ORF do cRNA.

FIGURA 3 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DO VIRUS SIN NOMBRE



FONTE: [www.cdc.gov/hanta/hps/noframes/hpsem.htm](http://www.cdc.gov/hanta/hps/noframes/hpsem.htm), 2006

Regiões não codificadoras terminais (NCR) 5' e 3' altamente conservadas e complementares entre si têm sido encontradas nos segmentos genômicos S, L e M dentro de um mesmo gênero da família *Bunyaviridae*, mas diferem entre os vírus dos distintos gêneros. Estas seqüências complementares permitem a formação, por meio do pareamento de bases, de estruturas estáveis em formato de raquete (*pan-handle*) e provavelmente conferem o aspecto circular do RNA observado em microscopia eletrônica. Esta região de complementariedade deve também ter importante participação na replicação, provavelmente servindo como uma estrutura de reconhecimento para a RNA polimerase dependente de RNA (SCHMALJOHN e PATTERSON, 1991; KUKKONEN, VAHERI e PLYUSNIN, 1998).

A nucleoproteína N codificada pelo segmento S é a proteína mais conservada dos hantavírus, é altamente imunogênica em humanos, o que a torna a primeira escolha como reagente em testes diagnósticos para detecção desta infecção viral. A ausência de um motivo de seqüência de aminoácidos conservado entre esta nucleoproteína, quando comparada com nucleoproteínas de outros vírus desta família (*Bunyavirus*, *Phlebovirus*, *Mairovirus* e *Tospovirus*), suporta a teoria de que determinadas estruturas secundárias, terciárias ou mesmo quaternárias, mas não a interação específica de suas seqüências, são as responsáveis pela interação com o RNA (TISCHLER et al., 2003). Análises comparativas entre seqüências nucleotídicas do segmento S dos hantavírus revelam seqüências variáveis, tanto na sua composição quanto na extensão, principalmente na região não codificadora na extremidade 3'(NCR). Partindo do princípio que a NCR 3' participa da replicação viral e do empacotamento da partícula, poderia se supor que ou o mecanismo de replicação difere de um hospedeiro para o outro ou a estrutura secundária mais do que a primária da NCR 3' é crucial para a sua própria atividade (PLYUSNIN, VAPALAHTI e VAHERI, 1996).

O segmento M apresenta uma fase aberta de leitura (ORF) principal (nt ~ 52 a 3465) que codifica uma glicoproteína precursora (GPP) de aproximadamente 1140 aa,

que posteriormente é clivada durante sua tradução em duas glicoproteínas (G1 e G2) (SCHMALJOHN e PATTERSON, 1991). O motivo WAASA é conservado, e se presume que seja o sítio de clivagem entre as proteínas G1 e G2 (LOEBER et al., 2001, SCHMALJOHN e PATTERSON, 1991). Três de quatro potenciais sítios de glicosilação da G1 são conservados em todos os hantavírus; no entanto, o 4.<sup>o</sup> sítio é conservado na G1 dos vírus descritos na Argentina e do vírus Prospect Hill (PHV), mas não é encontrado no vírus Laguna Negra (LNV). Um achado interessante é que os hantavírus associados com a subfamília de roedores *Murinae* têm mais sítios de glicosilação putativos em G1 do que os vírus das subfamílias *Arvicolinae* ou *Sigmodontinae*. As cadeias oligossacarídicas são componentes essenciais para o correto enovelamento ou estrutura das glicoproteínas e participam em muitas reações de reconhecimento de receptores e ligantes, podendo também determinar o reconhecimento das proteínas do envelope viral pelos componentes do sistema imune do hospedeiro. Portanto, diferenças no padrão de glicosilação poderiam estar relacionadas às diferenças patogênicas das cepas virais (TISCHLER et al., 2003). As posições de resíduos de cisteína nas proteínas G1 e G2 também são conservadas, assim como os resíduos de prolina, indicando uma estrutura tridimensional altamente conservada da proteína (ANTIC, WRIGHT e KANG, 1992).

Estudos comparativos de seqüências nucleotídicas e de aminoácidos entre distintos hantavírus têm demonstrado uma discreta variação entre as seqüências de aminoácidos da nucleoproteína e uma variação mais extensa entre as glicoproteínas G1 e G2. É razoável atribuir este achado de menor variabilidade da nucleoproteína à menor pressão seletiva a que N é submetida, quando comparada com a glicoproteína (VICENT et al., 2000).

O segmento L tem um tamanho aproximado de 6400 nt, e codifica uma proteína em torno de 250kDa que possui uma atividade de RNA polimerase dependente de RNA. Apesar dos vários estudos, muito pouco é conhecido sobre a localização precisa desta proteína nos vírions (SCHMALJOHN e PATTERSON, 1991). Comparações

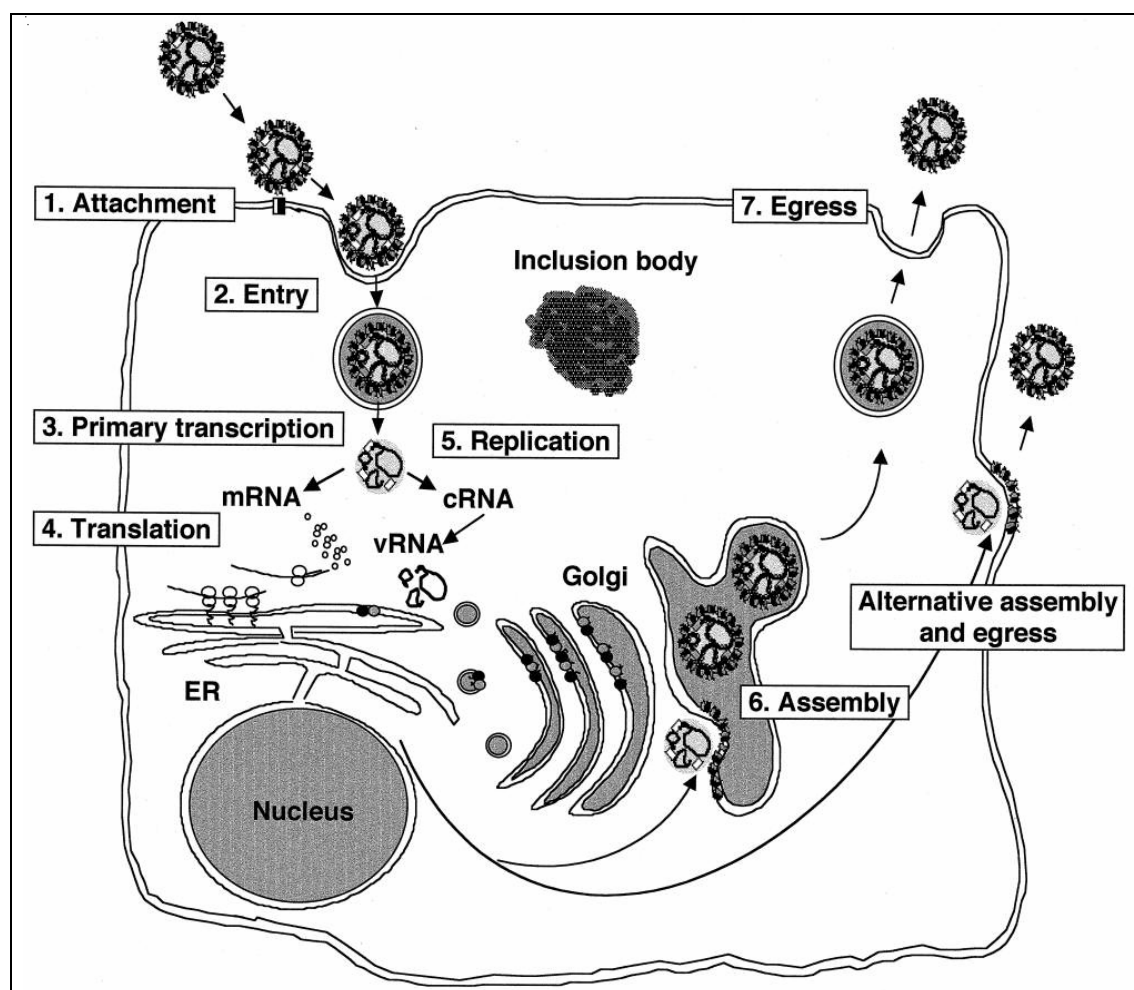
de seqüências nucleotídicas e de aminoácidos deste segmento demonstram que há uma conservação da estrutura primária da proteína, apesar da extrema variabilidade na seqüência nucleotídica. Esse achado poderia ser resultado da adaptação evolutiva do vírus ao *codon-usage* do hospedeiro (TISCHLER et al., 2003).

#### 1.1.2.2 Replicação viral

Os eventos iniciais no processo de infecção dos vírus desta família não são completamente definidos. A principal via de contaminação descrita é a respiratória; o contato inicial com o hospedeiro suscetível humano é principalmente via aerossóis contaminados por excretas de roedores e, entre os roedores as mordidas, em decorrência de seu comportamento agressivo (SCHMALJOHN e PATTERSON, 1991).

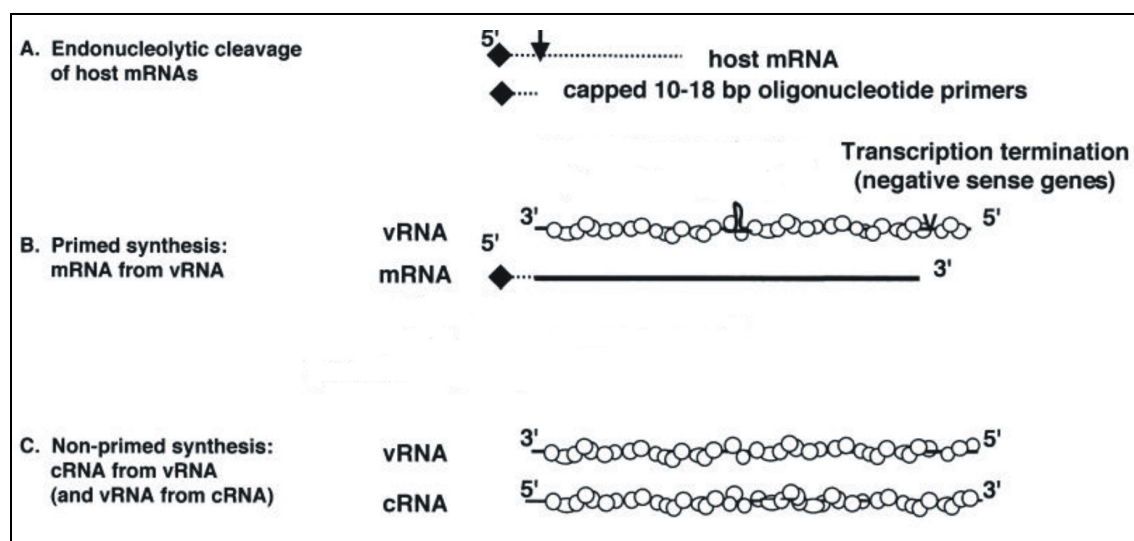
A penetração viral ocorre por meio da interação dos vírus com receptores celulares específicos, com subsequente endocitose. Gavrilovska et al. (1998) descreveram que o uso de vitronectina, proteína que se liga à  $\beta 3$ -integrina, inibe a entrada dos vírus SNV e New York (NYV) em células Vero E6, o que sugere que este provavelmente seja um receptor celular envolvido na penetração viral. Após a penetração, a replicação viral ocorre exclusivamente no citoplasma das células hospedeiras. Os nucleocapsídeos são liberados após a fusão do vírion com a membrana endossomal, iniciando-se o processo de transcrição primária dos genes virais. A RNA polimerase dependente de RNA é ativada e transcreve os três segmentos do RNA viral enquanto ainda estão associados com seus nucleocapsídeos. A enzima possui não apenas a atividade de polimerase, mas também de endonuclease, realiza a clivagem de um segmento de RNAm celular entre 12 e 15 nucleotídeos contendo um Cap5'- metilado que será posteriormente adicionado ao RNA viral transcrito, formando os RNAm (WHITE e FENNER, 1994). Segue-se o processo de tradução dos segmentos L e S nos ribossomos livres e dos RNAm do segmento M em ribossomos ligados à membrana concomitante com a glicosilação primária das proteínas de envelope. Após a tradução destes RNAm, ocorre a síntese do RNA viral

complementar, que será o molde para formação do RNA genômico (NICHOL 2001). Após a geração da glicoproteína precursora, ocorre a clivagem desta em duas glicoproteínas G1 e G2 no retículo endoplasmático rugoso e o seu acúmulo nas membranas do complexo de Golgi, onde ocorrem a glicosilação terminal e a associação com os nucleocapsídeos. Os vírions brotam das cisternas do Golgi e são transportados em vesículas que se fundem com a superfície basolateral da membrana citoplasmática, liberando as partículas virais por exocitose (figuras 4 e 5) (SCHMALJOHN e PATTERSON, 1991; WHITE e FENNER, 1994; HART e BENNETT, 1999).

FIGURA 4 - REPLICAÇÃO VIRAL: VÍRUS DA FAMÍLIA *BUNYAVIRIDAE*

FONTE: NICHOL, 2001

NOTA: 1- Ligação do vírion ao receptor celular; 2 - Penetração viral via endocitose mediada por receptor seguida de fusão da membrana do envelope viral com a membrana endossomal, permitindo a liberação dos ribonucleocapsídeos e da RNA polimerase dependente de RNA no citoplasma celular; 3 - Transcrição primária; 4 - Tradução do RNA viral; 5 - Replicação do RNA viral; 6 - Organização dos vírions no complexo de Golgi ou na membrana plasmática; 7 - Saída por brotamento em vesículas no complexo de Golgi seguido por exocitose ou brotamento pela membrana citoplasmática. E.R. - retículo endoplasmático. Caixas brancas e pretas – receptor celular. Círculos transparentes: proteína N. Círculos escuros: proteínas G1 e G2.

FIGURA 5 - TRANSCRIÇÃO E REPLICAÇÃO DO RNA (FAMÍLIA *BUNYAVIRIDAE*, GÊNERO *HANTAVIRUS*)

FONTE: Nichol (2002)

NOTA: A - transcrição do RNAm viral é precedida por clivagem endonucleolítica do *cap* e oligonucleotídeos adjacentes do RNAm do hospedeiro pela polimerase viral. B - Transcrição primária do RNA viral encapsidado em RNAm. C - Replicação: envolve a síntese independente de *primer* de RNA complementar (cRNA) a partir do RNAv, seguido da síntese do novo progênie de RNAv.

### 1.1.2.3 Filogenia

Análises filogenéticas de seqüências genômicas completas e parciais dos segmentos S e M, disponíveis dos hantavírus da Eurásia e das Américas, associadas aos roedores reservatórios, têm indicado uma sobreposição de suas árvores filogenéticas, sugerindo que a filogenia e a epidemiologia dos hantavírus estão intimamente ligadas aos seus respectivos reservatórios, e ambos são submetidos a um processo de co-evolução de longa duração (NICHOL et al., 1993; PLYUSNIN e MORZUNOV, 2000). Com raras exceções, cada hantavírus está associado a uma única espécie de roedor reservatório (PLYUSNIN, VAPALAHTI e VAHERI, 1996; MORZUNOV et al., 1998; MONROE et al., 1999).

Essa correlação vírus-reservatório torna a taxonomia dos hantavírus muito complexa e que ainda está sendo definida pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (CITV). Os critérios que devem ser considerados para identificação de espécies dentro do gênero *Hantavírus* sugeridos pelo CITV são: espécies encontradas em um nicho ecológico único, isto é, em uma diferente espécie ou subespécie de

roedor reservatório primário; espécies que exibam no mínimo 7% de diferença de aminoácidos pela comparação das seqüências completas das proteínas GPP e N; espécies que mostrem no mínimo uma diferença de quatro vezes em testes de neutralização cruzada; e espécies que não formem rearranjos naturais com outras espécies (PLYUSNIN, 2002).

Algumas limitações devem ser consideradas em relação aos critérios definidos pelo CITV, como a realização dos ensaios de neutralização em placa, pois estes vírus são difíceis de serem isolados em cultivo celular e freqüentemente são não citopáticos, tornando esta análise com freqüência impraticável (MONROE et al., 1999). Da mesma forma, associar a classificação dos hantavírus à caracterização do roedor reservatório tem sido bastante complexa, pois as análises de seqüências de DNA mitocondrial de roedores têm demonstrado que a especiação da subfamília *Sigmodontinae* é muito maior do que se conhecia, sendo que estes ainda estão sendo reclassificados tanto em espécie como em gênero (ENGEL et al., 1998; PLYUSNIN, 2002).

Na América do Sul, os hantavírus são numerosos e freqüentemente relacionados à nível de seqüência de aminoácidos, sendo seus padrões de diversidade mais complexos do que os vírus descritos na América do Norte. Este grande número de vírus e reservatórios já conhecidos, presumivelmente, reflete a rápida e relativamente recente evolução dos roedores nessa região (PETERS e KHAN, 2002). Como consequência da co-evolução destes vírus com seu hospedeiro natural, hantavírus de roedores relacionados apresentam fatores comuns, incluindo a patogenicidade para os humanos (KUKKONEN, VAHERI e PLYUSNIN, 1998). Isto provavelmente explica a marcante diferença entre hantavirose disseminadas por murídeos da subfamília *Arvicolinae* (Velho Mundo) e *Murinae* (Velho Mundo) daquelas disseminadas pelos *Sigmodontinae* (Novo Mundo) (CLEMENT, 2003).

Algumas características da hantavirose, descritas em alguns genótipos virais, ainda não podem ser completamente explicadas somente com os dados de seqüenciamento genético. Análise filogenética de hantavírus associados com SCPH



isolados na Argentina demonstra uma acentuada divergência entre as seqüências nucleotídicas. Porém as seqüências de aminoácidos são altamente conservadas, formando um grupo monofilético que contém vírus antigenicamente similares, mas geneticamente distintos (BOHLMAN et al., 2002; TISCHLER et al., 2003; PADULA et al., 2000a; PADULA et al., 2004a). Curiosamente, os relatos de transmissão inter-humana observada com o ANDV, contrastam com a falta de dados deste tipo de transmissão envolvendo outros hantavírus geneticamente muito próximos desta região (ENRIA et al., 1996). Da mesma forma, estudos filogenéticos com o vírus Laguna Negra (LNV), descrito no Paraguai (JOHNSON et al., 1997), demonstram algumas diferenças genéticas quando comparado com outros hantavírus associados à SCPH. Porém ainda não se sabe se estas alterações são responsáveis pelas diferenças clínicas relacionadas à infecção pelo LNV, como baixa mortalidade e alta taxa de indivíduos soropositivos nos estudos de soroprevalência (JOHNSON et al., 1997, JOHNSON et al., 1999). Observa-se também que existe uma estreita relação genética entre hantavírus relacionados à doença grave (HTNV, SEOV e PUUV associados com HFRS e SNV, BAYV e BCCV associados com SCPH) com aqueles que ainda não foram associados com doença humana (PHV, TUV e RMV). Tais observações têm levado alguns autores a sugerir que todos os hantavírus são potencialmente capazes de provocar doença, mas existiriam diferenças na extensão do risco de exposição ao vírus devido às várias características ecológicas e comportamentais dos diferentes reservatórios primários e outros fatores, como a predisposição genética do homem (RAVKOV et al., 1995; NICHOL, 2001).

#### 1.1.2.4 Variabilidade genética e evolução molecular

Vírus com genomas segmentados têm a capacidade de expandir sua diversidade genética seja por meio de acúmulo de mutações pontuais, seja alternativamente, mediante eventos de rearranjo genético que ocorrem entre os segmentos de progênes virais produzidos durante co-infecção (LI et al., 1995; HENDERSON et al., 1995;

BRIESE et al., 2006). As mutações pontuais parecem contribuir para a maioria das variações genéticas entre os hantavírus (SCHMALJOHN e HJELLE, 1997). A recombinação genética não tem sido relatada para estes vírus, porém rearranjos entre os segmentos dentro de uma determinada espécie parecem comuns (LI et al., 1995; HENDERSON et al., 1995).

Comparações de seqüências nucleotídicas dos segmentos S e M entre vírus de um mesmo genótipo resultam em um percentual de identidade muito similar; geralmente este percentual de identidade não difere mais do que 2%, sugerindo que, em muitos hantavírus, os dois segmentos têm evoluído em paralelo (LI et al., 1995; HENDERSON et al., 1995; LÓPEZ et al., 1997). Investigações realizadas com diversos isolados de SNV procuraram detectar a ocorrência de rearranjo genético e analisar se havia alguma correlação com a patogenicidade ou a epidemiologia da doença. Foi identificado que o rearranjo genético ocorre entre os segmentos destes vírus, e parece não ser ao acaso, sendo mais freqüentemente associado ao segmento M do que aos segmentos S e L. Estes dois últimos codificam para proteínas internas que devem interagir para resultar em uma replicação altamente eficiente. Portanto, o rearranjo seria mais viável para o segmento M, que codifica as proteínas de superfície, e que permitem uma maior variabilidade em suas seqüências ou apresentam uma maior oportunidade de seleção positiva. Esta capacidade de os SNV aumentarem a sua complexidade genética via rearranjo pode ter implicações significativas para a evolução destes vírus e para a epidemiologia da SCPH (LI et al., 1995; HENDERSON et al., 1995; SCHMALJOHN e HJELLE, 1997).

Com o intuito de mapear o fenótipo de virulência associado a um dos segmentos do genoma em particular do ANDV, McELROY et al. (2004) produziram uma variante viral composta pelos segmentos S e L do SNV (que não causam doença em modelo animal) e M do ANDV (patogênico em modelo animal). Os resultados observados indicaram que a variante gerada (ANDV/SNV) apresentava características *in vitro* similares ao ANDV; no entanto, quando injetada em hamsters, embora tenha estimulado uma alta resposta imunogênica, a variante viral não causou SCPH e não

foi letal, sugerindo que talvez os três segmentos do ANDV sejam necessários para definir o fenótipo letalidade para hamsters.

Uma outra abordagem utilizada para estudos de marcadores moleculares de virulência dos hantavírus é a adaptação de vírus em cultivo celular e em animais de laboratório. Nemirov et al. (2003), ao adaptarem o PUUV em cultivo de células Vero E6, verificaram uma diminuição da infectividade em roedores silvestres. Esta mudança fenotípica foi associada a alterações genéticas, com um acúmulo de mutações pontuais na região não codificadora do segmento S, mas não no segmento M. Análises mais extensas envolvendo outros vírus deverão ser realizadas para estabelecer-se de forma direta a correlação entre alterações genômicas e fenótipo viral.

### 1.1.3 Epidemiologia

A hantavirose apresenta-se como uma zoonose associada a roedores (robovírus) silvestres da família *Muridae*, subfamílias *Murinae* (Europa e Ásia), *Sigmodontinae* (América do Norte, Central e do Sul) e *Arvicolinae* (Hemisfério Norte), sendo que a sua distribuição geográfica e o padrão epidemiológico refletem a história natural e distribuição de seus reservatórios (NICHOL, 2001). Até o momento não foram descritos hantavírus na Antártida e nem na Austrália, presumivelmente pela ausência desta família de roedores nesses continentes (PETERS e KHAN, 2002; LEDNICK, 2003). Por razões desconhecidas ainda não havia sido descrito hantavírus na África, no entanto um estudo recente descreveu o primeiro hantavírus na região da República da Guiné, isolado de roedores (KLEMPA et al., 2006).

Estudos recentes de surtos de SCPH em diversos países sugerem que desequilíbrios ambientais criam condições que favorecem algumas espécies de roedores-reservatórios de hantavírus, resultando em um aumento no risco desta doença (VICENT et al., 2000). O surgimento da hantavirose, principalmente dos vírus associados à SCPH, é um exemplo de uma doença emergente devido a fatores

ambientais, que contribuem para o aumento de populações de algumas espécies reservatórios deste vírus (SCHMALJOHN e HJELLE, 1997; HJELLE e GLASS, 2000). Os distúrbios ambientais diminuem a diversidade das espécies e simplificam o ecossistema local, incluindo o agrupamento de roedores. *Calomys* e *Oligoryzomys* são gêneros de murídeos que se adaptam bem nessas áreas. Estes dados têm sugerido que uma amostragem de longa duração de populações de roedores em áreas intactas e áreas com distúrbio ambiental poderia ser utilizada para confirmar a hipótese de que há uma relação entre diminuição da biodiversidade e o aumento de número de roedores infectados por hantavírus (CARROL et al., 2005).

A transmissão ao homem ocorre via inalação de aerossóis contaminados com partículas virais presentes nos excretas dos roedores (LEE e VAN DER GROEN, 1989). A transmissão inter-humana é rara, tendo sido descrita em um surto na Argentina que envolveu 16 pessoas (ENRIA et al., 1996; WELLS et al., 1997; PADULA et al., 1998) e não pôde ser excluída em dois surtos familiares relacionados ao vírus ANDV no Chile (TORO et al., 1998). Análises filogenéticas recentes de quatro grupos de casos de SCPH em áreas onde circulam diferentes linhagens de ANDV na Argentina forneceram novas evidências de transmissão inter-humana deste vírus, após um contato próximo e prolongado do indivíduo infectado, durante a fase prodrômica da doença, com os contactantes (MARTINEZ et al., 2005).

Mais de 40 diferentes “genótipos” de hantavírus já foram descritos, inicialmente com base em testes de neutralização em placa e mais tarde confirmado e ampliado por testes de genotipagem. A metade dos vírus caracterizados apresenta relevância clínica (tabela 1). Os vírus protótipos envolvidos com doença humana são os vírus Hantaan (HTNV), Seoul (SEOV), Dobrava (DOBV) e Puumala (PUUV) na região da Eurásia, associados com a FHSR (LEE e VAN DER GROEN, 1989) (figura 6), e os vírus Sin Nombre (SNV) na América do Norte e Andes (ANDV) na América do Sul, associados com a SCPH (NICHOL et al., 1993; GALENO et al., 2002) (figura 1).

Hantavirose são doenças que ocorrem na maior parte dos casos em áreas rurais com altas densidades de roedores-reservatórios (galpões de armazenamento



TABELA 1 - GENÓTIPOS DE HANTAVÍRUS CONHECIDOS ATÉ 2006

SOROTIPO	ROEDOR PRINCIPAL (distribuição geográfica)	DOENÇA HUMANA (tipo de disseminação)
1. <b>Hantaan (HTNV)</b>	<i>Apodemus agrarius</i> (Ásia, Rússia Oriental e sudeste Europeu)	Grave: FHC, FHE, FHSR (rural)
2. <b>Seoul (SEOV)</b>	<i>Rattus norvegicus</i> (global)	Intermediária: FHSR (urbana e rural)
3. <b>Puumala (PUUV)</b>	<i>Clethrionomys glareolus</i> (Eurásia)	Leve: NE (rural)
4. <b>Dobrava (DOBV)</b>	<i>Apodemus flavicollis</i> (Balcãs, Europa Central, Oriental e meio-oriental)	Muito grave: FHSR (rural?)
5. <b>Sin nombre vírus (SNV)</b>	<i>Peromyscus maniculatus</i> (Canadá e EUA)	SCPH
6. <b>New York (NYV)</b>	<i>Peromyscus leucopus</i> (Canadá e leste EUA)	SCPH
7. <b>Black Creek Canal (BCCV)</b>	<i>Sigmodon hispidus</i> (Leste e oeste EUA, Venezuela e Peru)	SCPH
8. <b>Bayou (BAYV)</b>	<i>Oryzomys palustris</i> (Louisiana)	SCPH
9. Prospect Hill (PHV)	<i>Microtus pennsylvanicus</i> (América do Norte)	Desconhecido
10. El Moro Canyon	<i>Reithrodontomys magalotis</i> (EUA, México)	Desconhecido
11. Isla Vista	<i>Microtus californicus</i> (Califórnia, Oregon, México)	Desconhecido
12. Limestone Canyon	<i>Peromyscus Boylii</i> (Oeste EUA)	Desconhecido
13. Bloodshoe	<i>Sigmodon hispidus</i> (Sudeste EUA)	Desconhecido
14. Bloodland Lake	<i>Microtus ochrogaster</i> (América do Norte)	Desconhecido
15. Blue River	<i>Peromyscus leucopus</i> (EUA Centra)	Desconhecido
16. Khabarovski	<i>Microtus fortis</i> (Rússia)	Desconhecido
17. <b>Rio Mamoré (RMV)</b>	<i>Oligoryzomys microtis</i> (Bolívia e Peru)	SCPH
18. Rio Segundo	<i>Reithrodontomys mexicanus</i> (Costa Rica)	Desconhecido
19. Monongahela (MONV)	<i>P. maniculatus nubiterrae</i> (Canadá e leste EUA)	SCPH
20. <b>Laguna Negra (LNV)</b>	<i>Calomys laucha</i> (Paraguai e Bolívia)	SCPH
21. <b>Andes (ANDV)</b>	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i> (Argentina, Chile e Uruguai)	SCPH
22. Maciel (MACV)	<i>Necromys benefactus</i> (Argentina Central)	Desconhecido
23. Pergamino (PERV)	<i>Akodon Azarae</i> (Argentina Central)	Desconhecido
24. Juquitiba (JUQV)	Desconhecido (Brasil)	SCPH
25. Araraquara (ARAV)	<i>Bolomys lasiurus</i> (Brasil)	SCPH
26. Castelo dos Sonhos (CASV)	Desconhecido (Brasil)	SCPH
27. Hu 39694	Desconhecido (Argentina Central)	SCPH
28. Cano Delgadito (CDV)	<i>Sigmodon alstoni</i> (Venezuela)	
28. Orán (ORNV)	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i> (Nordeste da Argentina)	SCPH
30. Lechiguanas (LECV)	<i>Oligoryzomys flavescens</i> (Argentina central)	SCPH
31. Calabazo	<i>Zygodontomys brevicauda</i> (Panamá)	Desconhecido
32. Choclo (CHOV)	<i>Oligoryzomys fulvescens</i> (Panamá)	SCPH
33. Amur (AMRV)	<i>Apodemus peninsulae</i> (Leste da Rússia)	FHSR
34. Rio Mearim (RIMEV)	<i>Holochilus sciureus</i> (Nordeste do Brasil)	Desconhecido
35. Tobetsu	<i>Clethrionomys glareolus</i> (Japão)	Desconhecido
36. Topografov	<i>Lemmus sibiricus</i> (Nordeste Europeu)	Desconhecido
37. Thottapalayam (TPMV)	<i>Suncus murinus</i> (Índia)	Desconhecido
38. Thailand (THAIV)	<i>Bnadicota indica</i> (Tailândia)	Desconhecido
39. Tula (TUV)	<i>Microtus arvalis</i> (Europa)	Desconhecido
40. Saarema (SAAV)	<i>Apodemus agrarius</i> (Europa)	FHSR
41. Anajatuba (ANAJV)	<i>Oligoryzomys fornesi</i> (Nordeste do Brasil)	Desconhecido
42. Araucaria (ARAUV)	<i>Oligoryzomys nigripes</i> (Sul e Sudeste do Brasil)	SCPH
43. Sangassou	<i>Hylomyscus simus</i> (República da Guiné) África	Desconhecido
44. Central Plata	<i>Oligoryzomys flavescens</i> (Uruguai)	SCPH
45. Bermejo (BERV)	<i>Oligoryzomys chacoense</i> (Nordeste da Argentina)	SCPH

FONTE: Vicent et al. (2000), Clement (2003), Delfraro et al. (2003), Lednicky (2003), Suzuki et al. (2004), Raboni et al. (2005b), Rosa et al. (2005), Klempa et al. (2006)

NOTA: FHE: Febre hemorrágica epidêmica; FHSR: Febre hemorrágica com síndrome renal; SCPH: Síndrome pulmonar por hantavírus; FHC: Febre hemorrágica Coreana; NE: Nefropatia epidêmica. Genótipos em negrito: no mínimo um vírus isolado (humano ou roedor).

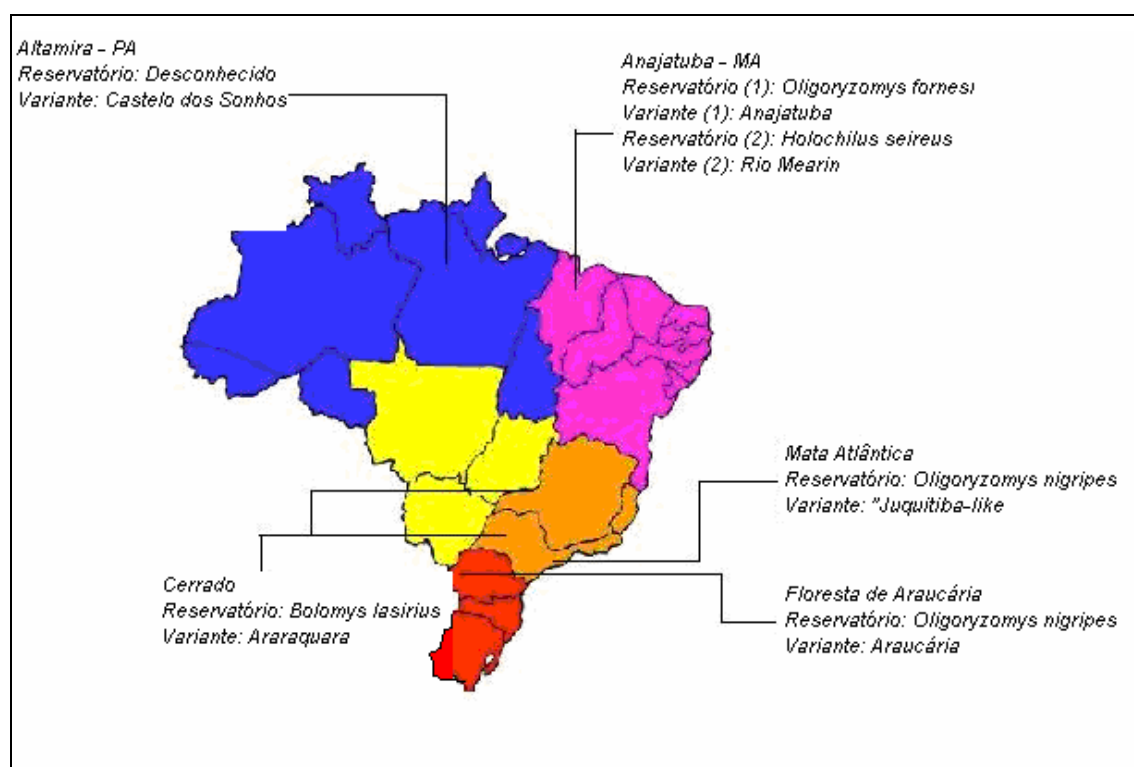
### 1.1.3.1 Hantavirose no Brasil

No Brasil, a demonstração da presença deste vírus em roedores ocorreu em períodos muito anteriores à descrição da SCPH nas Américas, como relatado em um inquérito sorológico realizado em roedores peridomésticos entre 1981-1983, no qual se evidenciou a presença de anticorpos anti-hantavírus na área urbana de Belém (56%), São Paulo (14%) e Recife (6%) (LeDUC et al., 1985; VASCONCELOS et al., 1992; HINDRICHSEN et al., 1993; IVERSSON et al., 1994).

A SCPH foi descrita no Brasil, pela primeira vez, em novembro de 1993, na região rural do município de Juquitiba, Estado de São Paulo, com a contaminação de três pessoas de uma mesma família, com dois óbitos. As amostras desses pacientes foram enviadas ao Centro para Controle de Doenças do EUA, onde esta infecção foi confirmada e o vírus identificado como Juquitiba (JUQV) (DA SILVA et al., 1997; VASCONCELOS et al., 1997). Atualmente a hantavirose é uma doença de notificação compulsória no Brasil. Com o início do treinamento técnico para a identificação e investigação de casos suspeitos, tem-se observado um crescente aumento na notificação desta doença. Até abril de 2006, haviam sido confirmados 692 casos no País, distribuídos principalmente entre as regiões Sul (46%, 305/663) e Sudeste (32%, 213/663) (BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO, 2006). Os prováveis reservatórios e as variantes virais identificadas até o momento, no Brasil, estão identificados na figura 7. O Estado do Paraná é a região do Brasil que tem o maior número de casos notificados de SCPH, segundo dados do Ministério da Saúde (22%). O Serviço de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde já identificou a doença em 12 unidades federadas e no Distrito Federal, sendo os casos principalmente relacionados à atividade rural. Há um maior comprometimento de pacientes do sexo masculino, a taxa de letalidade tem se mantido em torno de 40% e novos casos têm sido confirmados em todos os meses do ano, com uma leve preponderância nos meses de julho a outubro (ELKOURY et al., 2005). No ano de 2004 o número de casos detectados foi o dobro dos casos reportados em 2003. Tais surtos parecem estar relacionados com alterações climáticas como as que foram descritas no Distrito Federal e a ocorrência de fenômenos naturais como a “ratada” em Santa Catarina e Paraná (ELKOURY et al., 2005).

A caracterização genética dos hantavírus descritos no Brasil ainda está no início. A análise do RNA viral isolado a partir do primeiro caso de SCPH no Brasil (JUQV) foi inicialmente limitada a 139 nt correspondente à região que codifica a proteína G2 no segmento M (MONROE et al., 1999). Posteriormente, foram realizadas análises de fragmentos dos segmentos S e M de outras três amostras de soros de pacientes com SCPH que ocorreram em 1995. Uma amostra de um paciente que residia na cidade Castelo dos Sonhos (PA) e as outras duas amostras provenientes das cidades de Araraquara e Franca (SP). Desta forma foi possível a caracterização de dois novos hantavírus no Brasil, o vírus Araraquara (ARAV) encontrado nas amostras de Araraquara e Franca e o vírus Castelo dos Sonhos (CASV) (JOHNSON et al., 1999). Análises genéticas subseqüentes de amostras humanas de pacientes com SCPH e de roedores capturados nos prováveis sítios de infecção ampliaram a caracterização genética dos vírus *Juquitiba-like* e Araraquara e, também, permitiram descrever seus roedores reservatórios associados, *Oligoryzomys nigripes* e *Bolomys lasiurus*, respectivamente (SUZUKI et al., 2004).

FIGURA 7 - PROVÁVEIS RESERVATÓRIOS E VARIANTES VIRAIS IDENTIFICADOS NO BRASIL, 1993-2006



FONTE: Suzuki et al. (2004), Elkhoury et al. (2005), Raboni et al. (2005b), Rosa et al. (2005)



### 1.1.3.2 Soroprevalência

Os achados de alta soroprevalência de anticorpos anti-hantavírus específicos na população geral em algumas áreas da América Central e do Sul diferem consideravelmente do quadro epidemiológico visto na América do Norte (NICHOL, 2001). Uma baixa prevalência de anticorpos contra o SNV tem sido demonstrada no sudoeste dos EUA, 1,7% (SIMONSEN et al., 1995) e 0,7% (GONZALES et al., 2001). Na região central e sul da Argentina, onde os genótipos LECV e ANDV são os mais importantes, a soroprevalência também é baixa, em torno de 0,1% a 1,5% (LEVIS et al., 1997). No entanto, uma alta prevalência de anticorpos IgG tem sido demonstrada em outras regiões das Américas, como no Chile (ANDV) de 10% (RIQUELME et al., 2003), norte da Argentina (ORNV) acima de 20% e Paraguai (LNV), 12,8% na população geral e para populações indígenas uma prevalência de 57% (FERRER et al., 1998). São freqüentes os relatos de que populações indígenas apresentam maiores taxas de soroprevalência do que aquelas com ancestrais europeus (FREY et al., 2003).

Da mesma forma, no Brasil, estudos soro epidemiológicos têm demonstrado uma prevalência variável de anticorpos IgG em distintas populações. Durante um estudo sorológico em três cidades de São Paulo, próximas ao local onde o JUQV foi associado a casos de SCPH, detectou-se uma soroprevalência de 0,4% a 4,5% (HOLMES et al., 2000). No entanto, novas pesquisas têm sido conduzidas em áreas com ocorrência de casos de SCPH demonstrando altas taxas de soroprevalência, como 8,4% na cidade de General Carneiro, sudoeste do Paraná (RABONI et al., 2006), 13,3% em Anajatuba, Maranhão (MENDES et al., 2004) e 14,3% na população de Jardinópolis, São Paulo. Nesta população observou-se um maior percentual de casos positivos na população urbana do que na rural (FIGUEIREDO et al., 2003).

Algumas hipóteses poderiam explicar as diferenças de prevalência de anticorpos observadas nas populações da América do Sul e América do Norte, e mesmo em populações dentro de um único país. Pois existem relatos de inquéritos sorológicos realizados em regiões em que a população apresenta alta prevalência

de anticorpos anti-hantavírus e uma baixa taxa de mortalidade por SCPH, enquanto em outras áreas observa-se uma baixa soroprevalência na população com doença e alta taxa de mortalidade. Uma das hipóteses seria a co-circulação de cepas virais com diferentes graus de patogenicidade na América do Sul. (WILLIAMS et al., 1997; LEVIS et al., 1997; VICENT et al., 2000; SIMONSEN et al., 1995; FREY et al., 2003). Estudos realizados por Vicent et al (2000) no Panamá, visando identificar hantavírus associados a casos de SCPH, demonstraram esta co-circulação de vírus. Dois novos “genótipos” de vírus foram descritos: o Choclo, cujo reservatório é *Oligoryzomys fulvescens*, e o Calabazo, transmitido por *Zygodontomys brevicauda*. Vale notar que o vírus associado aos casos de SCPH foi o Choclo, encontrado em um menor número de exemplares de roedores capturados em contraste com o vírus Calabazo, que foi encontrado infectando uma maior quantidade de roedores. Também se observou que a mortalidade associada a estes casos foi bem inferior aos outros casos de SCPH associado ao gênero *Oligoryzomys* descritos na América do Sul (LEVIS et al., 1998). As infecções subclínicas dariam a esta população maior resistência à infecção e doença (FREY et al., 2003).

Outra hipótese considera que a constituição genética da população pode influenciar os diferentes índices de gravidade desta infecção (FERRER et al., 1998). As altas taxas de soroprevalência observadas no Paraguai poderiam ser conseqüências de uma maior resistência da população aborígene, talvez pela exposição contínua aos roedores. A prevalência e alta taxa de casos fatais observadas na América do Norte resultariam de uma baixa exposição, uma menor resistência genética à doença, ou ambos (SIMONSEN et al., 1995; FERRER et al., 1998; FREY et al., 2003). Estudo realizado por Mustonen et al. (1998), em casos de nefrite epidêmica (PUUV), sugere que há algumas evidências de que fatores do hospedeiro podem afetar a gravidade da doença, pois pacientes que têm alelos HLA-DRB1\*0301 e HLA-B8 estão associados com doença mais grave, enquanto aqueles com HLA-B27 têm uma doença com evolução mais benigna. Recentemente, descreveu-se que alguns indivíduos, especialmente que têm HLA-B8-DR3 estão associados com uma evolução mais grave

da infecção por PUUV. Hipóteses para explicar estes achados seria o desequilíbrio entre os alelos TNF2 e C4A nulo. Os portadores dos alelos TNF2 devem ter uma superprodução de TNF- $\alpha$ , que poderia causar o extravasamento vascular mais intenso. Como os portadores dos alelos C4A têm dificuldade de eliminação da viremia, teriam maior exposição ao vírus, o que levaria a uma hiperestimulação da resposta imune celular e conseqüentemente ao dano do endotélio vascular (TERAJIMA et al., 2004).

#### 1.1.4 Patogenia e Patologia

##### 1.1.4.1 Roedores

A infecção do roedor reservatório por hantavírus caracteriza-se pela ausência de doença e a capacidade de estabelecer uma infecção persistente que pode durar meses ou anos (LEE et al., 1981; MEYER e SCHMALJOHN, 2000). A transmissão horizontal parece ser a via mais importante de infecção entre os roedores (GLASS et al., 1998; PADULA et al., 2004b). Acredita-se que, entre os possíveis mecanismos relacionados à capacidade de os hantavírus serem refratários a resposta imune do hospedeiro-reservatório, estariam: a presença de uma infecção não-lítica, a capacidade de o vírus replicar em células do sistema imune como macrófagos e linfócitos e, também, as fases cíclicas da replicação viral (*downregulation*) (MEYER e SCHMALJOHN, 2000). No entanto, ainda não foi definido qual o papel de cada um destes fatores no processo da persistência viral em roedores.

Infecções por hantavírus em espécies do reservatório natural não levam à doença, ao contrário da infecção humana, e esta importante diferença provavelmente reflete uma distinta resposta imune do hospedeiro à infecção viral. No entanto, ainda não se determinou qual seria a importância dos anticorpos no curso da recuperação da infecção humana, bem como sua influência no estabelecimento e na manutenção das infecções assintomáticas persistentes no reservatório natural (RAVKOV et al., 1995).

#### 1.1.4.2 Humanos

Ao contrário das infecções assintomáticas em roedores, as infecções por hantavírus em humanos freqüentemente resultam em doença (NICHOL, 2001). O processo da doença humana começa após a inalação de aerossóis contendo as partículas virais e a deposição destas partículas no bronquíolo respiratório terminal e alvéolos. A viremia parece ocorrer subsequente à infecção do macrófago alveolar ou outro alvo primário, levando a infecção para as células endoteliais do sistema microvascular, particularmente, pulmões e em menor grau para outras células do corpo (ZAKI et al., 1995). A penetração celular do hantavírus é mediada pelos receptores  $\beta_3$ -integrinas (GAVRILOVSKAYA et al., 1998), que são receptores de adesão críticos presentes em células endoteliais, macrófagos e plaquetas, que atuam regulando a permeabilidade, a ativação e adesão plaquetária (MACKOW e GAVRILOVSKAYA, 2001). A replicação viral ocorre nas células endoteliais e macrófagos/monócitos sem causar qualquer efeito citopático (PENSIERO et al., 1992). O mecanismo responsável pelo aumento da permeabilidade vascular observada em ambas as doenças, FHSR e SCPH, não é completamente compreendido, sendo provavelmente de origem imunopatológica (SUNDSTROM et al., 2001).

Em pacientes com FHSR e SCPH, o número de linfócitos T CD8+ ativados encontra-se aumentado e resulta na relação inversa das células T CD4+/CD8+ (HUANG et al., 1994; NOLTE et al., 1995). Análises histopatológicas de pacientes com SCPH demonstrando associação de linfócitos T CD8+ com células endoteliais pulmonares (ZAKI et al., 1995), e a observação de que certos alelos HLA estão associados com um curso clínico mais grave (MUSTONEN et al., 1996; TERAJIMA et al., 2004), sugerem a importância do evento imunopatológico no processo de extravasamento que ocorre nas células endoteliais observadas na hantavirose (RAFTERY et al., 2002).

Classicamente é reconhecida a importância das células dendríticas como potentes apresentadoras de antígenos e conseqüentemente ativadoras da resposta imune celular (LAMBRECHT, PRINS e HOOGSTEDEN, 2001). Também tem sido

crescente o conhecimento acumulado sobre o número de vírus conhecidos que infectam células dendríticas humanas, interferindo em suas funções e escapando deste componente imune efetor (PEEBLES e GRAHAM, 2001). Destaca-se a demonstração da co-localização de antígenos de hantavírus com células dendríticas foliculares em baço e linfonodos, confirmando que hantavírus podem infectar produtivamente estas células (ZAKI et al., 1995). Esta infecção resultaria em uma estimulação do sistema do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) e induziria a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral ( $\alpha$ -TFN), óxido nítrico (NO) e  $\gamma$ -interferon ( $\gamma$ -INF), que têm profundos efeitos sobre a permeabilidade endotelial do capilar, causando o edema pulmonar e provavelmente a grave depressão miocárdica observadas na SCPH (ZAKI et al., 1995; NOLTE et al., 1995; MORI et al., 1999). Estes dados reforçam a hipótese de que uma potente resposta imune é estimulada pelos hantavírus, que poderia ser uma parte essencial da patogênese associada ao vírus (RAFTERY et al., 2002; PETERS e KHAN, 2002).

Além da intensa resposta imune celular, anticorpos neutralizantes estão presentes no soro dos pacientes na admissão hospitalar. Observa-se freqüentemente que altos títulos de anticorpos neutralizantes estão associados a uma maior probabilidade de sobrevivência (PADULA et al., 2000a; BHARADWAJ et al., 2000).

Um dos achados laboratoriais mais freqüentes nos pacientes com hantavirose é a trombocitopenia. O mecanismo envolvido não é claro, contudo a presença de número normal ou aumentado de megacariócitos na medula óssea, junto com a evidência de fibrinólise, sugere que o incremento no consumo ou o seqüestro das plaquetas são as prováveis causas. A possível presença de complexos imunes em pacientes com SCPH pode causar uma diminuição na contagem de plaquetas por indução da agregação plaquetária, lise mediada por complemento e seqüestro pelo sistema retículo endotelial (RAVKOV et al., 1995). A patogênese parece dever-se ao fato de estes vírus possuírem a capacidade de aderir às plaquetas sanguíneas, por meio de receptores de integrina ( $\beta_3$ ), desencadeando sua retirada da circulação (HART e BENNETT, 1999; PETERS e KHAN, 2002).

O estudo da patogênese da hantavirose, bem como o desenvolvimento de medidas de controle desta patologia tem sido prejudicado pela falta de um modelo animal que reflita a infecção humana. Um único relato anterior indicava que HTNV, responsável pela FHSR, causava uma doença neurológica em camundongos recém-nascidos (KIM e McKEE, 1985). Em 2001, Hooper et al. demonstraram que hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) desenvolvem uma doença letal semelhante à SCPH ao serem infectados com o ANDV, sendo este o primeiro modelo animal para doença grave associada ao hantavírus. Posteriormente observou-se que o vírus Maporal, um hantavírus isolado de roedor na Venezuela, e não associado à doença humana, também causa uma doença com manifestações clínicas similares à SCPH em hamsters sírios (MILAZZO et al., 2002). Mais recentemente, sinais de FHSR leve foram obtidos em primatas não humanos infectados pelo PUUV (KLINGSTROM et al., 2002). Certamente experimentos com estes animais proverão oportunidade para estudar o processo envolvido na patogênese das doenças, FHSR e SCPH.

#### 1.1.4.3 Achados anátomo-patológicos

As hantavirose, de um modo geral, apresentam poucas evidências histopatológicas de dano celular, sendo os rins, com uma nefrite tubulointersticial aguda, a glândula hipofisária e o átrio direito os órgãos mais acometidos na FHSR (NICHOL, 2001). Os pulmões são os órgãos mais lesados na SCPH, onde se descreve a presença de edema pulmonar, com discreta membrana hialina, infiltrado linfocitário intersticial (imunoblastos) e de macrófagos ativados (ZAKI et al., 1995; NOLTE et al., 1995). No entanto, pesquisas utilizando imunohistoquímica demonstram a presença de antígenos virais em diversos órgãos dos pacientes com SCPH, incluindo pulmões, rins, coração, baço, pâncreas, linfonodos, musculatura esquelética, intestino, glândula supra-renal, tecido adiposo, bexiga e cérebro. Os antígenos são finamente granulares e vistos de forma predominante dentro das células endoteliais de capilares e pequenos

vasos; no entanto, uma presença mais extensa de antígenos é encontrada nos cortes de pulmão (ZAKI et al., 1995).

### 1.1.5 Doença

#### 1.1.5.1 Febre hemorrágica com síndrome renal

A FHSR caracteriza-se por apresentar um período de incubação de duas a três semanas, seguida do início súbito de uma fase febril (prodromica) com sintomas semelhantes à influenza, febre, mal-estar, tremores e prostração, que dura de três a cinco dias. Durante esta pode ocorrer fase hemorragia, que se manifesta com um rubor cutâneo e(ou) hiperemia de conjuntivas e mucosas, decorrente da dilatação dos capilares, e edema retroperitoneal, que se manifesta como dores nas costas, decorrente do aumento da permeabilidade capilar (NICHOL, 2001). O início súbito e grave de albuminúria no 4.º dia da fase febril é uma característica da forma severa desta doença. Este sinal é seguido de hipotensão, trombocitopenia grave, petéquias, náuseas e vômitos e, em torno de 15% dos casos, choque; também pode ocorrer oligúria. A insuficiência renal contribui para a metade dos óbitos durante esta fase (SCHMALJOHN e HJELLE, 1997; NICHOL, 2001). Os sobreviventes entram em uma fase diurética, que pode durar meses, e em seguida na fase de convalescença, que dura de semanas a meses (tabela 2). Estas fases não são observadas em todos os doentes, e são descritos casos de evolução fatal muito rápida, assim como formas muito leves desta doença, sendo a sua causa ainda desconhecida (NICHOL, 2001; LEDNICKY, 2003). A mortalidade é diretamente relacionada com o genótipo viral envolvido na doença: infecções pelos vírus HTNV e DOBV têm uma taxa de mortalidade de 3% a 10%, o SEOV em torno de 1%, e o PUUV, que causa uma forma muito leve de doença, chamada de nefropatia epidêmica, tem uma taxa de mortalidade em torno de 0,2% (SCHMALJOHN e HJELLE, 1997; NICHOL, 2001). Dos vírus associados à FHSR somente o SEOV (associado à *Rattus norvegicus*) tem uma distribuição

universal. Estudos sorológicos em populações de roedores demonstram a presença deste vírus em todo o continente americano, no entanto relatos de doença associada a este hantavírus têm sido menos freqüente do que na Europa; não se sabe se isto é decorrente de uma menor suspeição diagnóstica ou se realmente a doença é menos freqüente nesse continente (NICHOL, 2001; SEIJO et al., 2003). O diagnóstico diferencial deve ser feito com leptospirose, hepatite A, influenza e outras febres hemorrágicas virais que podem ocorrer na mesma área das hantavirose (LEE, 1991; NICHOL, 2001; FERREIRA, 2003).

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DISTINTAS ENTRE FHSR E SCPH

DOENÇA (% mortalidade)	PATÓGENOS	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS <sup>(1)</sup>					
		Hemorragia	Azotemia: Proteinúria	Extravasamen to capilar pulmonar	Miosite	Hemorragia conjuntival	Dor ocular miopia
FHSR (moderada a grave) 1 - 15%	HTNV, SEOV, DOBV	+++	+++/ +++	+ / ++	+ / ++	++ / ++++	++ / ++++
FHSR (leve) <1%	PUUV	+	+ / ++++	- / +	+	+	++ / ++++
SCPH (protótipo) >40	SNV, NYV	+	+ / +	++++	-	- / +	-
SCPH (variante renal) >40%	BAY, BCCV, ANDV	+	++ / +++	+++ / ++++	++ / ++++	- / ++	-

FONTE: Schmaljohn e Hjelle (1997)

(1) Ocorrência máxima/mínima de uma característica: - raramente relatada. + infreqüentes ou manifestação leve. ++, +++, ++++ mais freqüente e manifestação mais grave.

#### 1.1.5.2 Síndrome cardiopulmonar por hantavírus

A SCPH apresenta-se como uma síndrome febril aguda caracterizada pelo grave comprometimento cardiovascular e respiratório que clinicamente assemelha-se à síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA) (NICHOL et al., 1993). O período de incubação estimado é de zero a 33 dias, com uma média de 15 dias (YOUNG et al., 2000). A SCPH caracteristicamente apresenta quatro estádios: febre prodrômica, fase cardiopulmonar, diurese e convalescença (figura 8) (PETERS e KHAN, 2002). No período prodrômico, que pode durar de três a seis dias, observam-se freqüentemente



febre, mialgias, náuseas e diarreia. Mais raramente são relatados vômitos, cefaléia, dor abdominal, dor torácica, sudorese, vertigem, tosse e dispnéia (NICHOL, 2001; PETERS e KHAN, 2002). A diferenciação entre a influenza e a SCPH está basicamente na ausência de sintomas de vias respiratórias altas, como dor de garganta e rinorréia que caracteristicamente está presente nos casos de influenza (MOOLENAAR et al., 1995). A fase cardiopulmonar dura em torno de dois a dez dias, e pode manifestar-se desde uma doença leve apenas com dispnéia até um grave comprometimento cardiovascular, insuficiência respiratória e instabilidade hemodinâmica. A hipotensão é comum nesta fase, podendo culminar com o choque. A doença progride rapidamente, necessitando hospitalização e assistência ventilatória nas primeiras 24 horas, sendo que o óbito ocorre em até 50% dos casos nos primeiros três dias de internamento (NICHOL, 2001; PETERS e KHAN, 2002). Nos sobreviventes, ocorre subitamente a diurese, usualmente associada com uma rápida melhora clínica (tabela 2). O curso e a duração da fase de convalescença são muito variáveis, mas muitos pacientes descrevem uma fadiga persistente e uma limitada tolerância aos exercícios por vários meses (VERITY et al., 2000; GALENO et al., 2002).

O quadro clínico da SCPH é muito similar entre diferentes genótipos de hantavírus encontrados em diferentes regiões da América do Norte, Central e do Sul (NICHOL, 2001). No entanto, algumas manifestações clínicas distintas têm sido descritas para alguns hantavírus em particular, como um maior comprometimento renal e a presença de miosite nas infecções pelos vírus BCCV e BAYV (HJELLE et al., 1996). Quadros de insuficiência renal são mais freqüentes em infecções por ORV no nordeste da Argentina (LEVIS et al., 1998). Manifestações hemorrágicas francas, petéquias e hiperemia facial são observados nos pacientes infectados pelo ANDV na Argentina e no Chile (GALENO et al., 2002; RIQUELME et al., 2003).

Os achados laboratoriais decorrentes da SCPH, embora não característicos, podem trazer suporte ao diagnóstico de um caso suspeito da doença. Dados de hemogramas obtidos durante o período prodrômico, tais como: hematócrito elevado, presença de imunoblastos (linfócitos atípicos) e trombocitopenia, podem ser evidências

de que um acometimento respiratório pode ocorrer em poucas horas, mesmo que os resultados radiográficos de tórax estejam normais (RIQUELME et al., 2003; VERITY et al., 2000). As alterações radiográficas torácicas mais comumente encontradas são: infiltrado intersticial bilateral progressivo, congestão hilar e peribrônquica e derrame pleural; após 24 a 48 horas surgem, de forma rápida, consolidação dos espaços aéreos e aumento progressivo do derrame pleural, se a evolução for favorável, essas anormalidades radiológicas desaparecem em poucos dias (KETAI et al., 1994; JENISON et al., 1995). Outros sinais e sintomas têm sido relatados e, em alguns casos, a doença pode não progredir do estágio prodrômico ou os sintomas clínicos podem estar completamente ausentes (RIQUELME et al., 2003). Baseando-se na sintomatologia clínica, o reconhecimento precoce desta doença não é fácil e pode ser confundido com doenças endêmicas prevalentes nas mesmas áreas, tais como dengue, leptospirose e influenza (NICHOL, 2001; PETERS e KHAN, 2002; FERREIRA, 2003).

A SCPH caracteriza-se em sua fase prodrômica por apresentar poucos sinais óbvios de uma doença clínica séria. Frequentemente estes pacientes são avaliados ambulatorialmente, liberados sem internamento e, em um período inferior a 24 horas, apresentam uma evolução pulmonar catastrófica (CHAPMAN et al., 2002). O desafio para o médico é identificar o paciente com SCPH nesse período prodrômico, permitindo uma intervenção imediata durante a súbita descompensação cardiopulmonar. Análises de regressão logística indicam que, juntas a hemoconcentração, a hipocarbúria e a trombocitopenia são importantes fatores na diferenciação de pacientes SCPH positivos dos SCPH negativos. Entretanto, antes do início do edema pulmonar a única anormalidade laboratorial consistente é a trombocitopenia, e este achado sozinho deveria prontamente levar à suspeita de infecção por hantavírus, pois é observado em mais de 80% dos casos (VERITY et al., 2000; CHAPMAN et al., 2002).

FIGURA 8 - PROGRESSÃO CLÍNICA DA SÍNDROME CARDIOPULMONAR POR HANTAVÍRUS

Fases	Pródromos	Cardiopulmonar	Diurese	Convalescência
Febre Mialgia				
Edema Pulmonar				
Choque				
Linfócitos atípicos ↓ Plaquetas ↑ Hematócrito ↑ Aspartato aminotransferase ↑ Desidrogenase láctica ↑ Tempo parcial de tromboplastina	± ± ± ± ± ±	++ ++++++ ++++++ +++++++ +++++++ +++++++		
	3-6 dias	7-10 dias	9-12 dias	

FONTE: CDC - <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hanta/hps/>

### 1.1.6 Diagnóstico

Diversas metodologias laboratoriais têm sido desenvolvidas para o diagnóstico das hantaviroses. Técnicas tradicionais como o cultivo celular, a detecção de anticorpos e a detecção de antígenos em ensaios de imunohistoquímica têm sido utilizadas em conjunto com métodos mais avançados de detecção viral, baseados na detecção do RNA viral (NICHOL, 2001). Estes últimos incluem: reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR), que permite, além da detecção, a caracterização genética do vírus (FELDMANN et al., 1993); testes de quantificação da carga viral pelo método de PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR) (AITICHOU et al., 2005); testes para a identificação de diversos genótipos de hantavírus pela análise de polimorfismo dos fragmentos clivados por enzimas de restrição (RFLP) (AHN et al., 2000), além da técnica de microarranjo de alta densidade de DNA (NORDSTRÖM et al., 2004).

O isolamento viral em cultivos celulares, seguidos por testes de redução-neutralização em placas (PNRT), permite a identificação inequívoca dos hantavírus.

Além disso, possibilita a produção de antígenos nativos para serem utilizados em ensaios sorológicos (LEE et al., 1985). O isolamento primário dos hantavírus é usualmente feito em culturas de células VERO E6. A infecção neste substrato não produz efeito citopático, sendo confirmada por imunofluorescência indireta ou RT-PCR após duas semanas da inoculação (LEE et al., 1985; GALENO et al., 2002; LEDNICKY, 2003). Esta metodologia diagnóstica, devido ao risco de manipulação destes vírus, deve ser realizada em laboratórios de nível de segurança biológica 3 ou 4 (HANTAVIRUS, 1993; LABORATORY, 1994), sendo uma técnica lenta, que requer pessoal treinado e, principalmente, apresenta uma sensibilidade muito baixa (ANH et al., 2000; NICHOL, 2001; PETERS e KHAN, 2002). É possível que a dificuldade de isolar-se hantavírus esteja puramente relacionada à baixa concentração de partículas infecciosas na fase de manifestações clínicas da doença. A viremia precede o aparecimento dos sintomas e desaparece rapidamente após o surgimento dos anticorpos neutralizantes, que podem estar presentes já na fase assintomática da doença (TERAJIMA et al., 1999; BHARADWAJ et al., 2000; LEDNICKI, 2003). Como a maior parte dos pacientes é atendida em uma fase mais avançada da doença, a neutralização das partículas virais contribuiria para a dificuldade no isolamento viral a partir do sangue de humanos. Isto foi observado na descrição do primeiro hantavírus isolado na América Latina a partir de amostra clínica, pois o material foi coletado antes do início das manifestações clínicas e em um período com sorologia IgG e IgM negativas, sugerindo que a viremia realmente ocorra antes do início dos sintomas, e que estes podem estar associados mais com a resposta imune humoral e celular do que com a quantidade de partículas virais circulantes (GALENO et al., 2002). Apesar de os antígenos virais serem detectados em células endoteliais, muito pouca morte celular ou necrose é observada (ZAKI et al., 1995). Possivelmente no momento da morte do paciente, muito da replicação viral ativa já tenha atingido seu pico e poucas partículas virais tenham se mantido (TERAJIMA et al., 1999).

O diagnóstico sorológico é o método de primeira escolha para a detecção da infecção por hantavírus (NICHOL, 2001). Os testes sorológicos para a detecção

de imunoglobulinas do tipo IgG e IgM são métodos altamente sensíveis, específicos e têm sido empregados rotineiramente na investigação de todos os casos suspeitos de hantavirose em laboratórios de referência para esta doença (NICHOL, 2001; PETERS e KHAN, 2002; LEDNICKY 2003). Classicamente o diagnóstico laboratorial da hantavirose era realizado por técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) ou ensaio imunoenzimático (EIE) utilizando antígenos virais nativos (JOHNSON, ELLIOT e HEYMANN, 1981; FELDMANN et al., 1993). Atualmente, devido aos altos índices de reações falso-positivas e a maior necessidade de treinamento técnico, a técnica de IFI foi substituída pelo ensaio imunoenzimático. Como as tentativas de isolamento viral têm sido infrutíferas na maioria dos casos, os ensaios sorológicos desenvolvidos baseavam-se na reação cruzada a partir de preparações antigênicas heterólogas produzidas com antígenos nativos obtidos em cultivo de células infectadas pelo vírus Prospect Hill (PHV), que até o momento não foi associado com doença (FELDMANN et al., 1993) e era produzido pelo Centro de Controle de Doenças dos EUA (CDC). No entanto, devido ao lento e variável crescimento do vírus em cultivo celular, a produção e a distribuição destes insumos para os ensaios sorológicos eram bastante limitadas. Por tal razão, a utilização de antígenos recombinantes em ensaios sorológicos tem sido um importante alvo de pesquisas (FELDMANN et al., 1993; ELGH, WADELL e JUTO, 1995; ELGH et al., 1997; NICHOL, 2001; PETERS e KHAN, 2002; LEDNICKY 2003).

Para a produção de antígenos recombinantes, a proteína N tem sido escolhida por ser um alvo antigênico mais sensível do que as glicoproteínas, e também por induzir inicialmente uma resposta humoral mais intensa, precoce e duradoura (ZÖLLER et al., 1989; KALLIO-KOKKO et al., 1993; LUNDKVIST, SCHOLANDER e NIKLASSON, 1993). A expressão deste antígeno recombinante é obtida utilizando sistemas procarióticos como *E. coli* ou eucarióticos como baculovírus e *Drosophila* (KALLIO-KOKKO et al., 1993; ZÖLLER et al., 1993; ELGH, WADELL e JUTO, 1995; VAPALAHTI et al., 1996; YOSHIMATSU et al., 1996; HJELLE et al., 1997; KALLIO-KOKKO et al., 1998; PADULA et al., 2000b). Foi demonstrado que os primeiros cem aminoácidos da região amino-terminal da proteína N do hantavírus constituem o

principal epítopo que estimula resposta humoral contra infecções por hantavírus (ELGH et al., 1996). Além disso, este domínio protéico permite classificar soros de pacientes com infecções agudas ou retrospectivas em dois distintos grupos, os associados com FHSR (HTNV, SEOV e DOBV) ou associados com SCPH e nefrite epidêmica (SNV e PUUV) (ELGH et al., 1997). No entanto, trabalhos mais recentes têm demonstrado que a utilização da proteína N recombinante íntegra em testes sorológicos reforça o potencial de reatividade cruzada entre os vários genótipos de hantavírus em decorrência da alta homologia da proteína de nucleocapsídeo (SCHMIDT et al., 2005), aumentando desta forma a sensibilidade da técnica. Apesar de a proteína N abrigar ambos os domínios, sorotipo específico e comum, as maiores diferenças antigênicas detectadas entre os diferentes genótipos têm sido relacionadas às proteínas do envelope G1 e G2 (JENISON et al., 1994; ELGH et al., 1997;). Por este motivo, para aumentar a especificidade e a sensibilidade dos ensaios sorológicos, atualmente a proteína N recombinante vem sendo empregada em testes de identificação dos pacientes com infecção aguda ou prévia por hantavírus (HJELLE et al., 1994; SCHMIDT et al., 2005), ao passo que os antígenos produzidos a partir da expressão das glicoproteínas são utilizados para a classificação dos genótipos virais em hantavírus associados à FHSR (HTNV, DOBV e SEOV) e os hantavírus associados com SCPH e nefrite epidêmica (SNV e PUUV) (JENISON et al., 1994).

O diagnóstico sorológico apresenta alta sensibilidade e especificidade, pois desde o início dos sintomas da infecção por hantavírus, anticorpos IgM e IgG estão presentes na maioria dos pacientes (SCHUBERT, TOLLMANN e WEISSBRICH, 2001). No entanto, há relatos de casos que demonstram uma soroconversão um pouco mais tardia; por tal motivo, quando há suspeita clínica com sorologia negativa, o teste deve ser repetido com nova coleta (VERITY et al., 2000). Em algumas formas mais leves da doença, como na nefropatia epidêmica, em que as manifestações clínicas podem ser variáveis, a suspeição diagnóstica acaba sendo mais tardia, assim a sorologia é o melhor método de detecção da infecção viral, pois, devido ao curto

período de viremia, as técnicas de detecção do RNA viral podem falhar (HUJAKKA et al., 2001).

O formato do ensaio imunoenzimático utilizando antígenos recombinantes tem sido muito variável nos diversos estudos realizados. O ensaio duplo-sanduíche, no qual as placas são sensibilizadas com anticorpo anti- $\mu$ , resulta em reações mais específicas, enquanto no ensaio indireto para detecção de IgM, alguns resultados falso-positivo para soros com infecções agudas para outros vírus não relacionados com SCPH foram observados (KALLIO-KOKKO et al., 1993). Para contornar este problema preconizam-se a inclusão de ensaios paralelos de detecção de IgG e a titulação das amostras.

As técnicas de biologia molecular, como a RT-PCR, que permitem a detecção do RNA viral têm se apresentado como uma valiosa ferramenta para o diagnóstico da hantavirose. É uma técnica rápida e não requer condições de biossegurança especiais, podendo ser utilizada a partir de diversas amostras clínicas como plasma, soro, coágulos, tecidos e em células mononucleares (AHN et al., 2000). A RT-PCR é um método de excepcional sensibilidade para o diagnóstico da infecção aguda por hantavírus. Em combinação com a técnica de seqüenciamento de DNA, ele oferece um nível de especificidade que não é possível com os métodos imunológicos para a detecção e tipagem viral (HJELLE et al., 1994). A associação da RT-PCR com o polimorfismo dos fragmentos digeridos por enzima de restrição (RT-PCR/RFLP) possibilita a identificação específica do genótipo viral envolvido com a infecção, além de permitir o diagnóstico em uma fase muito precoce da doença, antes da soroconversão, ou quando o isolamento não for mais possível devido aos anticorpos neutralizantes associados à partícula viral (AHN et al., 2000). Esta informação é valiosa, principalmente para os hantavírus associados com FHSR, pois diferentes formas de evolução clínica e distintos índices de mortalidade são claramente associados com diferentes genótipos de hantavírus (LEE et al., 1985). Quando o objetivo da técnica for detecção e tipagem simultaneamente, a amplificação de fragmentos do

segmento M deve ser preferida, pois a sequência genômica é menos conservada que a do segmento S, que permite a identificação de sorotipos diversos (AHN et al., 2000).

A técnica de PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR) permite a distinção entre os vírus responsáveis pela FHSR daqueles causadores da SCPH, cujos sintomas iniciais podem ser muito similares, e ainda a determinação da carga viral, que poderá eventualmente ser correlacionada com a evolução clínica e prognóstico, contribuindo para definir estratégias terapêuticas adequadas (AITICHOU et al., 2005).

Mais recentemente foi descrito o desenvolvimento de metodologias baseadas em microarranjos de alta densidade de DNA para a identificação e caracterização de diversos hantavírus (NORDSTRÖM et al., 2004). Por meio da imobilização em uma lâmina de vidro de várias sondas complementares às sequências genômicas depositadas em banco de dados de todos os hantavírus descritos, uma amostra (sangue, urina, liquor etc.) pode se analisada para infecção por distintos patógenos simultaneamente (WILSON et al., 2002). A introdução desta metodologia na rotina de investigação clínica depende diretamente de informações de sequenciamento genético e da caracterização do maior número de hantavírus possível (NORDSTRÖM et al., 2004).

#### 1.1.7 Tratamento e Prevenção

Até o presente momento não há vacina, drogas antivirais ou imunomoduladoras que protejam ou tratem a hantavirose. Este fato é um agravante, pois esta doença atinge adultos previamente saudáveis em todos os grupos etários, progride rapidamente e tem uma das taxas de mortalidade mais altas comparando com qualquer outra doença viral aguda (NICHOL, 2001; PETERS e KHAN, 2000; LEDNICKY, 2003). Associado a isto, os relatos de transmissão inter-humana desta doença (ENRIA et al., 1996; MARTINEZ et al., 2005) tornam o desenvolvimento de medidas de controle desta patologia mais urgentes.



Corticóides têm o potencial de modular a resposta inflamatória intrapulmonar modificando os níveis de citocinas, tais como a interleucina 1 $\beta$  e o fator de necrose tumoral, tendo sido usado no manejo das desordens pulmonares graves (MER e RICHARDS, 1998). Estudos feitos com metilprednisolona não demonstraram resultados estatisticamente significativos ao comparar os grupos de doentes sobreviventes com os que evoluíram para o óbito (RIQUELME et al., 2003). As manifestações clínicas não são patognomônicas para o diagnóstico de infecção por hantavírus, e em um estudo envolvendo casos do Chile, o diagnóstico clínico inicial foi incorreto em 80% dos pacientes contribuindo para um início tardio da terapia, o que pode estar associado com a baixa resposta relatada ao uso de corticóides (RIQUELME et al., 2003).

Apesar de a vacina que utiliza HTNV inativado estar disponível na Coreia desde 1990 (LEE, AN e SONG, 1990), ainda não há descrição de nenhuma vacina capaz de dar proteção cruzada e que possa conseqüentemente cobrir todas as infecções por diferentes hantavírus. A imunização em massa é improvável de ser oferecida devido à baixa incidência da doença; assim, é necessário que se identifiquem os grupos de risco buscando administrar a vacina especificamente (HART e BENNETT, 1999).

Estudos realizados com modelo de doença por hantavírus em hamsters sírios adultos (*Mesocricetus auratus*,) têm sido utilizados para avaliar a eficácia protetora de candidatos a vacinas, drogas ou imunoproliféricos (CUSTER, THOMPSON e SCHMALJOHN, 2003). Resultados preliminares têm demonstrado que a inoculação com ANDV provoca o desenvolvimento de SCPH fatal em 91% dos animais, e que imunizações prévias com os vírus HTNV, SEOV, DOBV, PUUV ou SNV protegeram estes hamsters contra a infecção pelo ANDV (HOOPER, CUSTER e THOMPSON, 2001). Inicialmente testou-se a aplicabilidade de vacinas de DNA baseadas no segmento M do vírus HNTV para proteger os hamsters contra o ANDV. Não houve resposta, sugerindo que a proteção cruzada, que havia sido obtida previamente com a infecção por HNTV, provavelmente foi devido à imunidade mediada por células contra as proteínas do nucleocapsídeo e as glicoproteínas, assim, o desafio com apenas o segmento M promoveria somente uma proteção parcial (CUSTER, THOMPSON e

SCHMALJOHN, 2003). Não há até o momento evidências que a RNA polimerase viral estimule imunidade humoral ou celular. Da mesma forma, vacinas de DNA com vetores construídos com uma associação de segmentos M dos vírus HTNV e ANDV falharam em proteger os hamsters da infecção por este último vírus. No entanto, recentemente foi observado que a imunização com a vacina de DNA baseada no segmento M do HNTV, associada a múltiplas doses de reforço, levou a um aumento dos níveis de anticorpos neutralizantes específicos e também à presença de anticorpos neutralizantes cruzados, protegendo estes animais da infecção pelo ANDV (HOOPER et al., 2006). Os autores discutem se a falta de imunogenicidade observada no experimento anterior ocorreu por razões técnicas ou se as glicoproteínas dos ANDV poderiam agir como inibidores da resposta imune do hamster permitindo a disseminação do vírus com conseqüências fatais (CUSTER, THOMPSON e SCHMALJOHN, 2003). No entanto, mais pesquisas devem ser realizadas com o intuito de confirmar esses achados (CUSTER, THOMPSON e SCHMALJOHN, 2003; HOOPER et al., 2006).

Relatos clínicos demonstrando que pacientes que apresentam altos títulos de anticorpos neutralizantes apresentam uma evolução clínica mais favorável, sugerem que a imunoterapia poderia ser uma opção de tratamento viável às pessoas expostas a SCPH (BHARADWAJ et al., 2000). Usando o modelo animal demonstrou-se que a transferência passiva de anticorpos de soro de macacos vacinados com vacina de DNA baseado em segmento M de ANDV protegeu os hamsters da infecção letal pelos ANDV quando administrado até o 5.<sup>o</sup> dia pós-exposição (CUSTER, THOMPSON e SCHMALJOHN, 2003). Este resultado indica que o desenvolvimento de anticorpos policlonais de primata, incluindo humanos, imunizados com esta vacina de DNA, poderia ser usado para tratar pessoas expostas à infecção por hantavírus associados ao SCPH, como trabalhadores de laboratório, pessoal médico ou contatos familiares com pacientes portadores desta infecção. Estudos futuros sobre o curso da SCPH no modelo de doença letal em hamsters fornecerão conhecimentos sobre a patogênese desta doença e permitirão que se formulem estratégias de profilaxia e terapia pré e pós-exposição (CUSTER, THOMPSON e SCHMALJOHN, 2003). Esses

relatos têm sido reforçados por trabalhos realizados em roedores e humanos em que se demonstrou que anticorpos maternos podem proteger contra infecções por hantavírus, sugerindo que a resposta imune humoral é um importante fator na determinação do curso da infecção e na evolução da doença (RIZVANOVA et al., 2003; YU et al., 2006).

## 1.2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A hantavirose é uma doença emergente nas Américas e no Brasil, onde números crescentes de notificações de casos têm sido relatados com uma taxa de mortalidade em torno de 40%. Ainda existem vários estados brasileiros que não possuem dados sobre esta infecção tanto em humanos como em roedores. A expansão das pesquisas nestas áreas possivelmente irá ampliar a detecção de hantavírus e seus potenciais reservatórios. Até o momento, nenhum hantavírus foi isolado no Brasil, e as amostras analisadas de casos clínicos ainda são muito limitadas, sendo escassas as informações sobre seqüências, organização genômica, dinâmica de transmissão e epidemiologia molecular de hantavírus. O acúmulo crescente de conhecimento sobre a caracterização destes vírus possivelmente irá revelar um panorama ainda mais complexo. Portanto, o desenvolvimento de métodos de detecção, identificação e caracterização biológica e molecular destes patógenos e seus reservatórios são fundamentais.

O presente trabalho teve como objetivos:

- Realizar o primeiro estudo clínico-epidemiológico no Estado do Paraná desde a descrição do primeiro caso de hantavirose notificado.
- Caracterizar os hantavírus circulantes no Estado do Paraná, mediante o seqüenciamento nucleotídico completo dos segmentos S e M que codificam as proteínas de nucleocapsídeo (N) e as glicoproteínas 1 e 2 (G1 e G2).
- Realizar análises filogenéticas usando todas as seqüências de hantavírus completas ou parciais depositadas em banco de dados.

- Desenvolver testes de diagnóstico molecular para detecção de RNA viral em amostras de pacientes e roedores, por meio da técnica de RT-PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos desenhados a partir das seqüências genômicas de hantavírus circulantes no Brasil.
- Desenvolver, padronizar e validar testes sorológicos específicos para detecção de anticorpos IgM e IgG dirigidos contra hantavírus, em amostras humanas e de roedores, utilizando antígenos recombinantes, o que tornará o Brasil auto-suficiente no diagnóstico desta patologia e provavelmente estimulará a realização de novos estudos e a geração de novos conhecimentos sobre a doença, o vírus e seus reservatórios.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 ESTUDO CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICO E PADRONIZAÇÃO DE TESTE MOLECULAR ESPECÍFICO (RABONI et al, 2005b. Anexo 1)

A síndrome cardiopulmonar por hantavírus foi relacionada a distintos genótipos virais encontrados nos diversos países do continente americano, sendo uma doença causada por uma resposta imune exacerbada. É uma doença de progressão rápida e com alta taxa de mortalidade. Na fase prodrômica, os sintomas da SCPH podem ser confundidos com outras doenças infecciosas, como leptospirose e influenza. O Estado do Paraná apresenta o maior número de casos notificados de todo o território brasileiro. A caracterização clínica desta doença, que permita a suspeição do diagnóstico, e o desenvolvimento de testes laboratoriais rápidos e com alta sensibilidade contribuirão para aumentar o conhecimento sobre os aspectos clínicos e epidemiológicos da hantavirose no Estado do Paraná, assim como possibilitarão um diagnóstico laboratorial rápido e preciso desta grave doença.

Em uma fase inicial realizou-se um estudo retrospectivo de todos os casos notificados de SCPH no Estado do Paraná, analisando nos prontuários médicos e fichas de notificação epidemiológicas, os dados demográficos, clínicos, laboratoriais e epidemiológicos dos pacientes. Um total de 98 pacientes com SCPH foram notificados no período de 1998 a 2004, observou-se que a maioria dos casos clínicos se concentravam na região do sudoeste do Paraná, que se caracteriza por ser uma área de reflorestamento com plantação de pinus (*Pinus elliottii*), a maioria dos pacientes trabalhavam no corte ou no transporte desta madeira. Uma distribuição sazonal desta doença pôde ser observada, com uma maior concentração dos casos no terceiro trimestre dos anos analisados, que correspondia ao período em que os trabalhadores tinham maior exposição, pois acampavam no local do trabalho. Os sintomas e sinais clínicos, descritos nos prontuários médicos,

relatavam com maior frequência a presença febre, cefaléia e mialgia. Os achados laboratoriais observados em maior percentual foram a hemoconcentração e a trombocitopenia. Não observou-se nestes pacientes manifestações clínicas como hemorragias, miosite e insuficiência renal, como já foram descritos em outros países.

Com o objetivo de padronizar um teste diagnóstico baseado em método de biologia molecular, foram selecionadas amostras de soros e coágulos de pacientes com SCPH que estavam armazenadas no LACEN-PR. Como não havia dados prévios sobre o genótipo de vírus que circulava no Estado do Paraná, optou-se por trabalhar com um grupo de oligonucleotídeos iniciadores degenerados previamente utilizados na investigação do genótipo LNV, descrito no Paraguai (JOHNSON et al, 1997). Os ensaios iniciais apresentaram resultados muito ruins, foram analisadas 12 amostras clínicas. Em apenas uma amostra clínica obteve-se um produto de PCR de um peso molecular de aproximadamente 400pb, amplificado a partir de uma *nested*-RT/PCR que utilizava oligonucleotídeos complementares ao segmento S do RNA viral. Este produto foi purificado e submetido ao sequenciamento genético. Posteriormente foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores baseados nesta seqüência genética, que foram utilizados para testar novamente todas as amostras previamente analisadas. A utilização destes oligonucleotídeos “regionais” aumentou a positividade do teste de 8,3% para 50% das amostras analisadas. A partir desta etapa fez-se uma parceria formal com o LACEN-PR, alíquotas de amostras de soro passaram a ser separadas no momento da chegada ao laboratório e encaminhadas ao Instituto de Biologia Molecular do Paraná, chegando em melhores condições para análise, observou-se um aumento significativo na positividade do teste. De um total de 22 amostras foram analisadas neste processo de padronização da técnica, obteve-se 70% de amostras positivas, valor considerado altamente satisfatório para o diagnóstico desta patologia. Estes resultados ressaltam a importância da utilização de oligonucleotídeos específicos para o(s) genótipo(s) circulante naquela região visando obter maior sensibilidade no teste para diagnóstico desta patologia.

## 2.2 HANTAVÍRUS NA AMÉRICA DO SUL: ANÁLISE FILOGENÉTICA DO SEGMENTO S DE CASOS DE SCPH NO PARANÁ, BRASIL (RABONI *et al*, 2005a. Anexo 2)

Após a primeira descrição de SCPH nos EUA, um crescente número de genótipos virais tem sido descritos em todas as regiões do continente americano. habitualmente cada genótipo está relacionado com uma espécie de roedor. a caracterização do genótipo do hantavírus, assim como de seu roedor reservatório, são fundamentais para correlacionar as distintas formas de evolução clínica e também orientar as condutas de controle de doença.

Visando caracterizar o(s) genótipo(s) viral que circula(m) no Estado do Paraná, assim como analisar sua relação filogenética com outros hantavírus descritos, realizou-se o sequenciamento completo do segmento S do RNA viral obtido a partir de amostras de soro ou coágulos de 12 pacientes com SCPH. Todos estes pacientes eram do sexo masculino, contraíram a doença na região de reflorestamento, porém eram de anos e cidades diferentes, e com evolução clínica distintas, alguns evoluíram para o óbito e outros sobreviveram.

Utilizando a técnica de *primer-walking*, em nove amostras, obteve-se o sequenciamento completo de todo o segmento, porém em três amostras não se conseguiu sequenciar os primeiros 135 nucleotídeos. Os vírus que foram completamente seqüenciados tinham um total de 1.904 nucleotídeos, com algumas exceções devido a deleções observadas na região 3' NCR. O alinhamento das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos da região codificadora de todos estes vírus demonstrou algumas divergências nucleotídicas, porém todas estas diferenças foram sinônimas, com exceção de uma mutação, que levou a troca de um aminoácido leucina por valina no códon 385. Esta substituição de aminoácido está também presente em outros genótipos virais como DOBV, HTNV, SEOV e TOPV .

Em uma fase seguinte foram construídos dendogramas para a análise das relações filogenéticas entre alguns genótipos de hantavírus selecionados. Em uma

primeira análise foi realizada a comparação utilizando a sequência nucleotídica completa da região codificadora do segmento S, tendo sido incluídos todos os genótipos virais que apresentavam esta sequência depositada no banco de dados (*Genbank*). Observou-se que as amostras do Paraná formaram um grupo bem definido (*bootstrap* 100%) dentro de uma *clade* que contém os hantavírus sul americanos, sendo este genótipo preliminarmente chamado de “araucária”(ARAUV). Visando realizar uma análise da relação entre este genótipo do Paraná com outros genótipos descritos no Brasil, que apresentavam apenas caracterização parcial depositadas no banco de dados, realizou-se a análise filogenética baseada neste fragmento menor da sequência do segmento S. Observou-se que os genótipos CASV e ARAV foram colocados em subgrupos diferentes das amostras do Paraná, apesar de que com menor confiabilidade para o genótipo CASV. Em uma fase seguinte construiu-se uma árvore filogenética baseada na sequência parcial de um pequeno fragmento do segmento S (330 nucleotídeos), onde foram incluídos genótipos virais descritos no Paraguai. Nesta análise observou-se que as amostras do Paraguai não se colocavam todas em um mesmo grupo, ao contrário distribuíram-se entre os 3 distintos subgrupos sul americanos. Nesta análise dois genótipos, ITA37 e ITA38, foram localizados no mesmo grupo das amostras do Paraná. Apesar de que o fragmento analisado é muito pequeno para trazer informações evolutivas, esta localização dos genótipos paraguaios junto com as amostras do Paraná ocorreu com um bom suporte de confiabilidade.

Esta foi a primeira caracterização genética completa realizada com um segmento do RNA de um hantavírus brasileiro. As análises filogenéticas deste segmento indicam que os vírus do Paraná formam um grupo distinto, que localiza-se dentro do ramo onde estão outros hantavírus sul americanos. A proximidade genética observada entre os genótipos do Paraná e os genótipos ITA37 e ITA38, correlaciona-se bem com a distribuição geográfica destes genótipos. Ambos foram encontrados em regiões que compartilham as mesmas características de ecossistema, sendo que as amostras do Paraguai foram isoladas a partir do roedor *Oligoryzomys*



*nigripes* e as amostras do Paraná exclusivamente a partir de humanos. Estas características regionais permitem pressupor que estes genótipos são um único vírus. Somente com a continuidade do sequenciamento dos outros segmentos do RNA viral e análise de roedores capturados na região tais afirmativas poderão ser confirmadas.

A caracterização genética realizada até o momento não permitiu definir marcadores moleculares de gravidade desta doença, somente com a continuidade desta investigação, que inclua caracterização genética de outros segmentos virais do vírus, de um maior número de amostras de pacientes com evoluções clínicas diversas e, a caracterização dos roedores reservatórios, poderão trazer maiores conhecimentos sobre a dinâmica desta doença.

### 2.3 HANTAVIROSES NO BRASIL: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO E *IMMUNOBLOTTING* BASEADO EM ANTÍGENO RECOMBINANTE (RABONI et al, 2006. Anexo 3)

A hantavirose é uma doença de notificação obrigatória no Brasil, devendo a confirmação dos casos incluir a investigação laboratorial por meio da pesquisa de anticorpos da classe IgG e IgM, que é realizado nos Centros de Referência Regionais. O diagnóstico é realizado pelo método de ensaio imunoenzimático, sendo utilizado para este antígenos recombinantes cedidos pelo Centro para Controle de Doenças e Prevenção (CDC, EUA) ou pelo Instituto Dr Carlos G Malbrán (Argentina). Apesar de apresentarem bons resultados nos ensaios clínicos, tais reagentes não passaram por nenhum processo de validação para ser utilizado no diagnóstico sorológico da hantavirose no Brasil.

No desenvolvimento dos ensaios imunológicos tem se demonstrado que a nucleoproteína N é um antígeno altamente imunogênico e para o qual observa-se a presença de anticorpos desde a fase inicial da doença, além de apresentar altas taxas de reatividade cruzada. Por tais motivos tem-se preferencialmente trabalhado com este antígeno nos kits de diagnóstico. A utilização de antígenos nativos obtidos a partir de cultivos celulares também tem sido uma opção para o diagnóstico, no entanto os problemas técnicos relacionados ao isolamento destes vírus são importantes limitações na utilização destes.

Com o objetivo de obter um teste com maior sensibilidade e principalmente, visando uma ampliação do diagnóstico da hantavirose no Brasil, por meio da disponibilização de reagentes para as diversas regiões e baseados em antígenos virais que circulem nestes locais, realizou-se a produção de um antígeno recombinante baseado na nucleoproteína N, caracterizada por sequenciamento genético do segmento S do RNA viral isolado a partir de uma amostra brasileira.

Para a produção do antígeno recombinante foi realizada a clonagem de um produto de PCR, amplificado a partir do segmento S, que codifica uma proteína de

343 aminoácidos. A clonagem foi realizada em um vetor de expressão PQE-30 e utilizado para transformar linhagens de células bacteriana (*E coli* M15). Neste sistema obteve-se a expressão de uma proteína de fusão que contém 6 resíduos de histina na sua região amino-terminal que permitiu a purificação por cromatografia por afinidade. A proteína obtida apresentou uma massa molecular aproximada de 48KDa e foi reconhecida especificamente em reações imunológicas, sobre membranas de nitrocelulose, utilizando anticorpos anti-histidina e soro de pacientes com SCPH. Em uma fase subsequente, padronizou-se a reação para a pesquisa dos anticorpos IgG e IgM pelos métodos de *immunoblotting* e ensaio imunoenzimático indireto (kit IBMP).

Após a padronização da técnica sorológica, iniciou-se o processo de validação desta reação, para tal foram analisados 613 amostras de soros de roedores e humanos classificados de distintos grupos: (1) pacientes com suspeita clínica de SCPH; (2) pessoas saudáveis que moram em região de alta incidência da doença; (3) doadores de banco de sangue de região de baixa incidência da doença; (4) soros de roedores e humanos com suspeita clínica de hantavirose de distintas regiões do Brasil e de países da América do Sul (Argentina e Uruguai); e (5) soros de pacientes com doenças agudas não-SCPH.

No processo de avaliação do antígeno recombinante as amostras foram analisadas comparando seu resultados com outros dois testes: (1) kit comercial: ensaio imunoenzimático indireto para detecção de IgM e IgG, que utiliza como antígenos um pool de anticorpos recombinantes (nucleoproteína N) truncados dos genótipos HTNV, SNV, PUUV, DOBV (*Focus Technologies*); (2) testes caseiros realizados nos Centros de Referência, que são: um ensaio imunoenzimático indireto para detecção do anticorpo IgG e um teste de captura para detecção do anticorpo IgM, que utilizam os antígenos recombinantes cedidos pelo CDC (EUA) ou pela Instituto Carlos G Malbrán (Argentina).

No processo de avaliação da desempenho do antígeno recombinante obteve-se resultados muito bons com o kit IBMP, o teste para IgM apresentou uma

sensibilidade de 94,1%, especificidade 99,1%, valor preditivo positivo de 88,8% e negativo de 99,5%. O teste para IgG apresentou uma sensibilidade de 95,2%, especificidade 98,4%, valor preditivo positivo de 91% e negativo de 99,2%. Observou-se também um alto percentual de concordância entre os resultados obtidos com a análise das amostras provenientes da Argentina e Uruguai, destacando a reatividade cruzada para este antígeno entre os distintos genótipos de hantavírus que circulam nestas regiões.

Atualmente o kit IBMP está em uma fase de avaliação pelo Ministério da Saúde, que tem como objetivo distribuí-lo para os Laboratórios de Referência e também para os Laboratórios Regionais onde a doença ocorre com maior frequência.

### 3 DISCUSSÃO

A SCPH é uma doença emergente, e desde que foi descrita nos EUA em 1993, tem sido detectada em todas as regiões do Brasil. Entretanto, dados sobre a caracterização molecular dos vírus que circulam, assim como sua dinâmica de transmissão, potenciais reservatórios, soro prevalência em populações humanas e de roedores e o real impacto desta patologia em saúde pública, ainda são muito escassos. Uma análise da série histórica de casos de hantavirose no Brasil fornece um bom panorama da evolução da doença, indicando que o aumento do conhecimento acumulado sobre diferentes aspectos da doença, as espécies de roedores potencialmente implicados na transmissão do vírus, além da busca ativa de casos e(ou) reservatórios, têm permitido a detecção de circulação de hantavírus e o aumento das notificações.

O alto índice de notificações de casos de SCPH observado no Estado do Paraná deve-se historicamente a uma vigilância epidemiológica atuante, e uma sazonalidade particular da doença. Os primeiros relatos da hantavirose no estado são anteriores a 1993 e foram diagnosticados com base em dados clínico-epidemiológicos.

Com o intuito de realizarmos a primeira caracterização molecular completa dos hantavírus circulantes no Paraná, suas relações filogenéticas com outros vírus presentes na América do Sul, além do perfil clínico da doença e sua prevalência em varias regiões, implementamos este estudo no final de 2003.

Inicialmente, foi realizado um levantamento de todos os dados clínicos e epidemiológicos dos casos de hantavirose diagnosticados no Paraná, por meio da análise retrospectiva dos prontuários médicos e das fichas de notificação epidemiológica do período de 1998 a 2004, contabilizando 98 casos sorologicamente notificados. Esta revisão compreende o maior número de casos clínico-epidemiológicos de hantavirose na América Latina já publicados na literatura médica. Como a notificação da SCPH é feita apenas após a confirmação sorológica, sendo este exame realizado unicamente nos pacientes hospitalizados, não contamos com dados para pesquisar

a existência de variabilidade nas manifestações clínicas da doença, que poderia se apresentar com sintomas mais brandos, como foi descrito no estudo de Riquelme et al. (2003). Entretanto, mesmo sem contar com esses dados, podemos supor que devam existir infecções brandas ou mesmo assintomática, tomando por base o estudo de soro-prevalência realizado na população de General Carneiro-PR, onde a presença de anticorpos da classe IgG anti-hantavírus foi detectada em 8,4%, dos indivíduos investigados. De acordo com as fichas epidemiológicas de todos os pesquisados, nenhum sintoma sugestivo de SCPH foi relatado (RABONI et al., 2006). Altos índices de positividade para anticorpos IgG têm sido relatados em estudos realizados em outras regiões do Brasil. Em Jardinópolis, São Paulo, foi detectado soro-prevalência de 14,3% (FIGUEIREDO et al., 2003) e 13,3% em Anajatuba, Maranhão (MENDES et al., 2004), sendo que nenhuma das pessoas que soro converteram preenchia os critérios que definem SCPH, indicando que formas clínicas leves ou assintomáticas da doença são freqüentes. Estes resultados reforçam a afirmativa de que existem formas subclínicas da doença, entretanto, mais estudos são necessários para se determinar se este achado é decorrente da co-circulação de cepas virais menos patogênicas, como sugerem Vicent et al. (2000) ou de uma doença com um amplo espectro de manifestações clínicas. Os trabalhos de soro prevalência devem ser interpretados com cuidado e idealmente ser ampliados, pois a amostragem ainda é limitada e variáveis como exposição a roedores devem ser melhor analisadas.

Os resultados deste estudo clínico-epidemiológico permitiram concluir que no Paraná a hantavirose é uma doença associada essencialmente à atividade rural. Porém, diferentemente do que acontece nas demais regiões do País, a maioria dos casos de SCPH é detectada em áreas de reflorestamento de pinus (*Pinus elliottii*), que compreende grandes extensões de terra, na região centro-sul do estado, e que em determinados períodos recebe grande contingente de trabalhadores rurais contratados para o corte das árvores. Esses indivíduos, em sua maioria adultos jovens e do sexo masculino, acampam durante esse período em condições precárias, estocam

alimento e outros víveres, o que atrai um grande número de roedores silvestres (reservatórios), e culminam por contaminar-se durante essas atividades. Por tal motivo, provavelmente há um grupo de maior risco e, também, uma diferença na sazonalidade observada das notificações, em que os casos ocorrem mais no segundo semestre do ano, período do corte da madeira. Em contraste com casos observados em outras regiões do País quanto à distribuição temporal, onde os casos ocorrem em todos os meses do ano (ELKHOURY et al, 2005). Entretanto, em alguns anos há um maior número de notificações devido a alterações ambientais. Por exemplo, em períodos de seca, quando ocorre uma diminuição de oferta de alimentos aos roedores em seu hábitat natural, observa-se um aumento de casos decorrentes da invasão destes animais nas residências dos agricultores (FERREIRA, 2003), ou de fenômenos naturais como a “ratada” em que há um aumento natural na população de roedores, relacionado à florada das taquaras que ocorre a cada trinta anos (ELKHOURY et al., 2005).

Nos prontuários de pacientes com SCPH que foram avaliados, os sinais e sintomas dominantes foram: febre, dispnéia, mialgias, náuseas, vômitos, cefaléia, tosse e dor abdominal; entre os dados laboratoriais, a hemoconcentração ( $Ht > 50\%$ ) e a trombocitopenia ( $<150.000/mm^3$ ) foram observadas na maioria dos pacientes e, nos casos em que a radiografia de tórax pôde ser analisada, a maioria apresentava infiltrado intersticial e alveolar. Nesta análise, assim como nas séries de pacientes descritos por Duchin et al. (1994) e Wells et al. (1997), os sintomas clínicos iniciais foram muito semelhantes aos da FHSR. No entanto, nenhum paciente apresentou hemorragia e insuficiência renal, ao contrário do que tem sido relatado nos casos de SCPH associados ao ANDV no Chile, em que são observadas manifestações hemorrágicas, como petéquias, epistaxe, microhematúria, sangramento em pontos de punção, hematêmese e hemoptise (TAPIA, MANSILLA e VERA, 2000; CASTILLO, NARANJO e OSSA, 2001). Também não foram descritas nos casos analisados miosite e insuficiência renal grave, como já foi relatado em infecções por BCCV e BAYV nos Estados Unidos (PETERS e KHAN, 2002). O reconhecimento precoce

desta patologia, com base exclusivamente nas manifestações clínicas, não é fácil de ser realizado. Em casos suspeitos, alguns parâmetros clínicos, laboratoriais e epidemiológicos devem ser considerados, entre eles a presença de febre alta, mialgia, taquipnéia, ausência de envolvimento de trato respiratório alto, hemograma apresentando hemoconcentração e trombocitopenia, e o relato de contato com roedores ou seus excretas.

Apesar das altas taxas de soro prevalência na população de trabalhadores do corte de pinus (19,7%) (Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, dados não publicados) e na população da cidade de General Carneiro (8,4%), observou-se neste estudo uma taxa de letalidade em torno de 39%. Dados estes que se afastam do relatado por Vicent et al. (2000) no surto no Panamá (25%).

Quando iniciamos o estudo sobre a caracterização molecular dos hantavírus circulantes nas diferentes regiões do Estado do Paraná, recebemos amostras de soro e sangue total de pacientes com SCPH, que estavam armazenadas no laboratório Central do Estado (LACEN-PR). Com o intuito de padronizar um teste de RT-PCR a partir do RNA viral obtido destas amostras, foram sintetizados oligonucleotídeos degenerados, baseados na sequência nucleotídica descritos para o LNV (JOHNSON et al., 1997). Após inúmeras tentativas infrutíferas foi obtido um fragmento de 434 pb (peso molecular esperado) de uma única amostra. Esta amostra foi, em seguida, seqüenciada e, a partir disso, novos oligonucleotídeos foram desenhados, baseados na sequência específica da amostra, o que permitiu aumentar a positividade do diagnóstico por PCR de 8,3% para 50% nas amostras de pacientes com suspeita de SCPH. A partir deste ponto do trabalho, estabelecemos uma colaboração formal com o LACEN, e passamos a receber uma alíquota de soro de pacientes com suspeita de hantavirose. Estas amostras foram enviadas rapidamente para a investigação, sem manipulação prévia e desta forma passamos a ter uma positividade nos testes de RT/PCR em torno de 70%, valores bem superiores aos que têm sido relatados com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores genéricos (SUZUKI et al., 2004). Estes dados indicam o aumento significativo de sensibilidade de detecção de RNA viral em



amostras biológicas relacionados ao uso de reagentes específicos (oligonucleotídeos) desenhados em função das seqüências genômicas de vírus circulantes nas regiões de interesse.

Entre os métodos de biologia molecular para o diagnóstico laboratorial da hantavirose, a técnica de PCR em tempo real poderá ser um avanço trazendo subsídios para melhor compreensão desta patologia. O desenvolvimento de testes de quantificação da carga viral possibilitaria, além do diagnóstico da patologia, observar se há correlação entre carga viral e evolução clínica. No entanto, alguns fatores acabam por limitar a implantação desta metodologia principalmente para a construção das curvas de calibração que necessitam de amostras de vírus titulados em cultivo celular, dificultando sua realização já que a manipulação destes patógenos exige condições de segurança biológica nível 3 (NB3). Como alternativa para contornar esta dificuldade, as curvas de calibração do qPCR têm sido feitas a partir de clones contendo insertos correspondentes aos segmentos S e(ou) M que são transcritos *in vitro* para gerar RNA viral. Porém os resultados observados podem não refletir a real carga viral presente nas amostras clínicas.

Após a implantação do diagnóstico por RT/PCR, doze amostras de pacientes positivas para hantavírus foram selecionadas para realizar o estudo filogenético. A seqüência genômica completa do segmento S das amostras foi determinada pela primeira vez para um vírus circulante no Brasil e deve contribuir para uma análise mais abrangente, pois a maioria dos estudos filogenéticos disponíveis utiliza amostras virais provenientes de roedores, sendo que muitos destes vírus ainda não foram relacionados com doença humana. A caracterização filogenética com amostras humanas permite identificar o roedor-reservatório responsável pela doença em uma determinada região; apontar possíveis marcadores de virulência e analisar se a mudança de hospedeiro pode estar associada com alguma variabilidade genética viral.

As amostras selecionadas para a análise filogenética provêm de pacientes com distintas evoluções clínicas, de diferentes regiões do estado e de épocas diferentes de infecção (RABONI et al., 2005b). A idéia do estudo seria identificação de

marcadores moleculares de gravidade. A comparação das seqüências nucleotídicas e de aminoácidos das doze amostras demonstrou uma alta similaridade entre estes vírus, com exceção de uma substituição de aminoácido. Estes resultados indicam que até o momento somente um único genótipo responsável pela SCPH no Estado do Paraná foi identificado e que agrupa em uma *clade* distinta dos demais vírus brasileiros ARAV e CASV. Este genótipo foi denominado vírus Araucária.

Com exceção da amostra HPR/04-102, de um paciente que se infectou na região central do estado, as outras eram de cidades próximas à região sudoeste. Essas regiões compreendem uma área de floresta atlântica interior e floresta de araucárias. Embora neste estudo não tenha sido realizada a análise de roedores dessas regiões, duas publicações prévias relatam a presença de roedores positivos para hantavírus em capturas no Paraguai e Brasil (CHU et al., 2003; SUZUKI et al., 2004). No estudo do Paraguai, o seqüenciamento parcial de segmento S de hantavírus foi realizado em alguns roedores capturados, entre estes os genótipos ITA 37 e 38 detectados em roedores *Oligoryzomys nigripes*. A análise filogenética baseada no segmento S, realizada em nosso estudo, demonstrou que as amostras humanas do Paraná agrupavam-se com as amostras ITA 37 e 38, com um valor de *bootstrap* de 100%. Como a região do Paraguai onde estes roedores foram capturados é próxima à fronteira do Paraná, e compartilha com este as mesmas características de vegetação, supomos que o provável roedor-reservatório do vírus que caracterizamos fosse o *Oligoryzomys nigripes*. Curiosamente, na descrição do genótipo ITA afirmava-se que nessa região do Paraguai não havia a detecção de casos de SCPH, ao contrário do que era observado no Paraná. No entanto, recentemente, foram feitas as primeiras notificações de casos de SCPH nesta região do Paraguai (Norma Coluchi, Laboratório de Saúde Pública, Assunção, Paraguai, comunicação pessoal).

Semelhante à complexa ecologia dos hantavírus na Argentina (LEVIS et al., 1998), acredita-se que haja uma complexidade muito similar nos países vizinhos como Paraguai e sudeste do Brasil. Em captura de roedores realizada na região de General Carneiro-PR demonstrou-se a presença de três espécies soropositivas para

hantavírus, o *Oligoryzomys nigripes* (19/181), *Akodon sp* (4/181) e *Thaptomys sp* (1/181). Destes obteve-se a caracterização genética parcial do segmento M do hantavírus que infectava a espécie *Oligoryzomys nigripes* (SUZUKI et al, 2004).

Recentemente finalizamos o seqüenciamento nucleotídico completo do segmento M, que codifica as glicoproteínas G1 e G2 de uma amostra clínica (RABONI et al., 2006). A análise comparativa da seqüência genômica parcial do segmento M do RNA viral obtido de roedores *Oligoryzomys nigripes* (SUZUKI et al., 2004) depositada no banco de dados, e do segmento M completo obtido desta amostra clínica analisada durante este estudo, revelou uma alta similaridade nucleotídica entre os vírus Araucária e *Juquitiba-like*. A classificação de novos genótipos de hantavírus e a complexa relação vírus-roedor reservatório devem ser alteradas com a geração de novos dados sobre a caracterização molecular dos hantavírus e a identificação e classificação dos roedores.

Um exemplo sobre a complexidade de interpretação e classificação dos hantavírus pode ser observado em um estudo realizado no Nordeste do Brasil. Em áreas com notificação de casos de SCPH foram realizadas capturas de roedores, dois genótipos de hantavírus, a variante ANAJV detectado no roedor *Oligoryzomys fomesi* e a variante RIMEV associada ao roedor *Holochilus sciureusforam1*, foram encontrados. A análise filogenética baseada em seqüências nucleotídicas parciais do segmento S destas variantes revelou um alto grau de similaridade ao RMV, um vírus associado ao *Oligoryzomys microtis*, um roedor que nunca foi encontrado no Nordeste do Brasil (ROSA et al., 2005).

Análises de seqüências de pequenos fragmentos do genoma viral podem confundir ou fornecer resultados pouco confiáveis sobre a caracterização de novos tipos virais. Associado a isto, a classificação dos roedores baseada apenas em caracteres morfológicos pode ser confusa e errônea, levando à interpretação de que um mesmo genótipo viral circule em distintos reservatórios. A designação de espécies dentro do gênero *hantavirus* é um problema ainda em discussão, que requer estudos de caracterização genéticos mais extensos, o desenvolvimento de ensaios de neutralização

cruzada entre os distintos vírus e uma melhor caracterização dos roedores reservatórios (PLYUSNIN, 2002).

A análise do segmento S realizada neste estudo não permitiu detectar uma “assinatura” molecular no segmento S dos hantavírus analisados, pois, apesar das diferenças na evolução clínica observada, sete óbitos em doze pacientes, diferentes regiões e datas de infecção, a sequência da nucleoproteína era idêntica em todos os casos. Múltiplos fatores parecem estar relacionados com as distintas formas de evolução clínica, dentre estes são citadas a variabilidade genética do vírus e a constituição genética do indivíduo infectado (PETERS e KHAN, 2002; RAVKOV et al., 1995; NICHOL, 2001; TERAJIMA et al., 2004). Provavelmente a determinação da sequência das glicoproteínas G1 e G2 irá fornecer novas informações sobre a variabilidade genética destes vírus.

Avanços nos métodos de diagnósticos de infecções virais emergentes é o passo mais importante para a detecção e o controle destes patógenos. Considerável atenção tem sido recentemente direcionada para as infecções emergentes e re-emergentes, considerando que infecções graves podem ser importadas e(ou) disseminadas para toda uma região em um período muito curto de tempo. Para as infecções virais mais freqüentes, como citomegalovírus, herpes simplex, HIV entre outros, há uma série de testes e painéis de controles de qualidade externos disponíveis, o que permite uma rápida e eficiente padronização de novas metodologias. No entanto, para as infecções virais mais raras, porém muito graves como a hantavirose, não há controles de qualidade externos que permitam esta padronização. Assim, o diagnóstico desta patologia tem sido feito pela utilização de testes caseiros ou testes comerciais submetidos unicamente à avaliação interna.

A extensão da doença causada por hantavírus em diferentes regiões do mundo é conhecida somente parcialmente, sendo um dos maiores obstáculos para isto a pouca disponibilidade de antígenos para o diagnóstico. Como a SCPH é uma doença de evolução muito rápida e ocorre com maior freqüência em regiões com atendimento de saúde precário, estima-se que provavelmente um percentual significativo

de casos não seja detectado. Por tal motivo o desenvolvimento de metodologias diagnósticas de baixo custo e de fácil execução permitirá a descentralização e conseqüentemente mais fácil acesso da população ao diagnóstico. No Brasil este panorama não é muito diferente, pois a centralização do diagnóstico, limitada a três laboratórios de referências e a dependência da doação de antígenos produzidos em outros países para o diagnóstico desta patologia, certamente são fatores limitantes para o estudo e o conhecimento da hantavirose.

Buscando alternativas para o aperfeiçoamento do diagnóstico desta patologia, permitindo rápida investigação dos casos clínicos suspeitos, análise de soroprevalência de anticorpos anti-hantavírus em populações de áreas de alta incidência da SCPH e identificação de roedores positivos para hantavírus, um dos objetivos deste trabalho foi o desenvolvimento de um ensaio diagnóstico que permitisse a detecção desta patologia em investigações sorológicas. Para tal, foi produzido um antígeno recombinante a partir dos primeiros 343 aminoácidos do segmento S, que codifica a proteína de nucleocapsídeo. Este domínio da proteína foi selecionado por conter um epítopo altamente imunogênico e com capacidade de detectar infecções cruzadas por distintos genótipos de hantavírus (SJÖLANDER et al., 1997)

O antígeno recombinante rNΔ<sub>85</sub> apresentou alta reatividade em ensaios sorológicos que utilizaram soros de pacientes com diagnóstico confirmado de SCPH. Durante o processo de padronização, a melhor alternativa foi o formato de ensaio imunoenzimático indireto para a aplicação deste antígeno no diagnóstico imunológico para detecção das duas classes de imunoglobulina, IgM e IgG contra hantavírus. O processo de avaliação do desempenho deste antígeno recombinante envolveu a análise de 613 amostras de soro (570 humanos e 43 roedores), coletados em diferentes regiões do Brasil e da América Latina (Uruguai, Argentina e Chile) e divididos nos seguintes grupos: casos confirmados de SCPH, indivíduos assintomáticos de regiões de alta e baixa prevalência da doença, e pacientes com outras doenças infecciosas agudas. A inclusão da grande quantidade de soros e da ampla distribuição e variedade de amostras permitiram uma análise completa do desempenho deste kit em

situações clínicas bastante diversas, assim como possibilitou a inclusão gradativa de modificações no teste visando melhorar a sensibilidade e especificidade. O ensaio com o kit “IBMP EIE IgM e IgG Hantec” foi feito em paralelo com outros dois kits, um comercial de EIE indireto (*Focus Technology, Inc*) e outro caseiro de EIE captura produzido no Instituto Dr J Maztegui, Pergamino, Argentina. Os resultados discordantes foram analisados pelo método de *immunoblotting*, utilizando o antígeno rNΔ<sub>85</sub>.

Alguns fatores críticos devem ser considerados na padronização de uma metodologia diagnóstica, entre eles a determinação do teste padrão-ouro que confirma a presença ou ausência da doença. O isolamento viral habitualmente tem sido considerado como teste padrão-ouro no diagnóstico virológico; entretanto, as limitações técnicas e a baixa sensibilidade deste teste podem ser limitantes na sua aplicação rotineira, como ocorre com os hantavírus. Uma alternativa para realizar a padronização do teste foi a utilização de exames em paralelo, ou seja, realizar um maior número de testes possível, pois quanto maior fosse a concordância destes resultados, maior seria a probabilidade de o resultado ser verdadeiro (FLETCHER R.H., FLETCHER S.W., WAGNER, 1989). Alternativamente, realizamos o teste de *immunoblotting*, como padrão ouro, pois nesta metodologia há uma apresentação de proteína viral em uma outra conformação. Além disso, este formato de teste permite a visualização de qualquer reatividade inespecífica das amostras de soro com proteínas bacterianas eventualmente presentes nas preparações do antígeno. Esta metodologia tem sido utilizada de rotina como teste confirmatório em infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (CURRENT, 1988) e também por alguns autores no diagnóstico confirmatório da hantavirose (YOSHIMATSU et al., 1996).

A utilização de ensaio diagnóstico caseiro para a detecção da hantavirose tem sido uma prática comum na maioria dos países, principalmente em locais onde a hantavirose é endêmica, como em alguns países europeus. No entanto a padronização destes tem sido problemática. Estudo realizado para analisar diversos testes de diagnóstico para detecção de infecção por hantavírus em 18 distintos laboratórios europeus demonstrou que o desempenho dos testes comercial e caseiro foi similar

(83%: caseiro e 87%: comercial), assim como as metodologias EIE e IFI para detecção de IgG e IgM. Contudo, a metodologia *immunoblotting* pareceu ser discretamente mais sensível do que o EIE e a IFI (BIELE et al., 2003). Um dado preocupante é que, neste estudo, o resultado correto para amostras IgG positivas foi observado em 76% dos casos e em apenas 53% dos IgM positivos. A análise pode ter sido prejudicada pelas condições das amostras (como diluições prévias), ou mesmo pela variabilidade na capacidade de apresentar reações cruzadas de alguns genótipos particulares de hantavírus (JENISON et al., 1994; HJELLE et al., 1997). No entanto, ficou clara a necessidade de melhorar muitos os ensaios atualmente disponíveis, objetivando um desempenho melhor dos testes diagnósticos no futuro. Observa-se nas publicações de padronização de kits para hantavírus que geralmente um pequeno número de soros é analisado, e que esta escassa quantidade de amostras bem caracterizadas tem sido um fator limitante nesta avaliação. No presente estudo pode-se observar a importância da inclusão de um maior número de soros na análise, pois alguns resultados falso-positivos e falso-negativos puderam ser detectados, o que permitiu a introdução de algumas alterações técnicas visando a sua diminuição, assim como forneceu dados mais robustos para os cálculos de sensibilidade e especificidade do teste.

Na padronização do kit “IBMP EIE IgM e IgG Hantec” observou-se que houve uma alta concordância nos resultados dos testes realizados com amostras de diferentes regiões do Brasil e de alguns países da América Latina, demonstrando a reatividade cruzada entre estes vírus para a nucleoproteína N (BHARADWAJ et al., 2000; TERAJIMA et al., 2004). Estudos subsequentes de caracterização genética dos vírus circulantes na América Latina e no Brasil poderão contribuir para a identificação de hantavírus genética e antigenicamente distintos, que poderão ser incluídos no kit (antígenos recombinantes) para aumentar sua sensibilidade (FELDMANN et al., 1993; SCHMIDT et al., 2005). A caracterização do segmento M de vírus detectados em distintos roedores poderá trazer maiores informações da variabilidade destes vírus e as proteínas recombinantes G1 e G2 também poderiam ser utilizados em testes de

*immunoblotting* para distinção dos genótipos virais. A inclusão de antígenos que diferencie os sorotipos de hantavírus neste teste permitiria a introdução de uma sequência estratégica em que se faria um EIE pan-reativo como ensaio de primeira linha e o *immunoblotting* para tipagem das amostras EIE positivas.

Como citado anteriormente, uma limitação na avaliação de novos kits diagnósticos está na disponibilidade de painéis de soro bem caracterizados. Tais soros deveriam ser provenientes de regiões onde circulam distintos genótipos virais, permitindo determinar o antígeno adequado para um determinado teste em uma dada localização geográfica (DOYLE, BRYAN e PETERS, 1998). Na padronização do kit “IBMP EIE IgM e IgG Hantec” observou-se um maior percentual de resultados discordantes nas amostras que estavam armazenadas há um período maior de tempo e que foram submetidas a vários ciclos de descongelamento independente da região geográfica. O desempenho do kit foi considerado excelente, sendo capaz de detectar infecções por hantavírus em amostras provenientes de todas as regiões do Brasil, assim como amostras humanas e de roedores da Argentina, do Uruguai e do Chile (RABONI et al 2006).

A escolha do formato do teste sorológico para o diagnóstico de hantavírus (EIE ou *immunoblotting*) dependerá de fatores como os custos do ensaio, o trabalho técnico envolvido, o número de amostras, potencial para automação e a experiência dos técnicos que realizarão os testes. Existem na literatura alguns trabalhos que preconizam testes de captura para detecção de IgM contra hantavírus, e apontam nos testes EIE indiretos uma maior quantidade de reações cruzadas, o que conseqüentemente poderia apresentar mais resultados falso-positivos. Considerando todos os fatores e associado à alta reatividade observada para o antígeno rNΔ<sub>85</sub>, decidimos manter a metodologia de ensaio imunoenzimático indireto, com a introdução de algumas modificações para aumentar a especificidade da metodologia, como associar a pesquisa do anticorpo IgG junto com o IgM e a titulação das amostras IgM positivas. A sorologia positiva deve ser interpretada com cuidado em casos que se baseiem em uma única amostra de soro ou em que o teste IgG foi negativo.



Na fase inicial de padronização dos testes, foram analisadas outras metodologias, além da realização de testes em duplicata. As amostras eram incubadas paralelamente com o antígeno rNΔ<sub>85</sub> e com antígeno de *E. coli* (controle negativo), da mesma forma foi testado se a inclusão de antígenos bacterianos ao tampão de amostra poderia diminuir reações inespecíficas. Não foram observadas diferenças nos resultados com relação aos valores de corte da reação, nem na interpretação final do resultado.

Schubert, Tollmann e Weissbrich (2001) avaliaram um ensaio imunoenzimático pan-reativo comercial que utiliza a metodologia indireta para a pesquisa de anticorpos IgM anti-hantavírus em comparação com a técnica de *immunoblotting*. Foi detectado no EIE, reações IgM fracamente positiva ou indeterminada em pacientes com infecções agudas por Citomegalovírus e vírus Epstein Barr, indicando uma menor especificidade deste teste. No entanto, foi possível aumentar a sensibilidade e especificidade, tanto do teste EIE como o *immunoblotting*, com a introdução de algumas modificações, entre elas associar a pesquisa de IgG à pesquisa do anticorpo IgM, pois a presença dos dois tipos de anticorpos no início da doença é observada na maioria dos pacientes (PADULA et al., 2000a; PETERS e KHAN, 2002), e incluir no teste um *pool* de antígenos recombinantes de diferentes hantavírus (ZÖLLER et al., 1993; KALLIO-KOKKO et al, 1993; SCHUBERT, TOLLMANN e WEISSBRICH, 2001).

A ativação policlonal que ocorre em algumas infecções virais e parasitárias é uma limitação no emprego da técnica de EIE para o diagnóstico laboratorial (ALPERS, SCHEID e BAUER, 1994), não deixando de ser diferente no caso da hantavirose. Com a finalidade de minimizar este problema, algumas alternativas têm sido sugeridas como o cálculo do index da amostra, que é a razão entre a densidade ótica da amostra e o valor de corte do teste (SCHUBERT, TOLLMANN e WEISSBRICH, 2001). Amostras com index acima 1.5 e a pesquisa em paralelo dos dois anticorpos, IgG e IgM, com resultados positivos também são altamente indicativos de especificidade (KALLIO-KOKKO et al, 1998; SCHUBERT, TOLLMANN e WEISSBRICH, 2001). A adoção de tais modificações na metodologia permitiu a obtenção de resultados altamente

satisfatórios, com altos índices de concordância entre os Centros de Referência. Os resultados obtidos durante a padronização foram altamente satisfatórios, após os quais o Ministério da Saúde optou pela distribuição do kit “IBMP EIE IgM e IgG Hantec” para todos os Centros de Referência e alguns laboratórios estaduais do Brasil.

Observa-se um aumento gradativo na detecção de casos de hantavirose no Brasil nos últimos anos. Claramente, o controle dos roedores é crucial para a prevenção da hantavirose. Estes programas baseiam-se na implantação de medidas que impeçam o contato do homem com os roedores e seus excretas. O controle desses reservatórios naturais do vírus no ambiente silvestre não é prático e pode levar ao desequilíbrio ecológico. Não há uma terapia específica disponível para as doenças causadas pelos hantavírus, a terapia de suporte durante a hospitalização precoce é importante e útil, sendo que a capacidade de o médico detectar esta doença em uma fase inicial e diferenciá-la de outras patologias será fundamental para diminuir a mortalidade observada nesta patologia (~40%).

Investigações eco-epidemiológicas seguidas de análises de caracterização molecular dos hantavírus e estudos de soro prevalência populacional devem ser ampliadas a todos os ecossistemas, com vistas a se conhecer, cada vez mais, a história natural da hantavirose no Brasil. O desenvolvimento de insumos para o diagnóstico desta patologia é o primeiro passo para tornar o Brasil independente na detecção deste vírus em amostras clínicas e de roedores, o que certamente contribuirá para que se obtenham maiores informações sobre as hantavirose em nosso meio.

## 4 CONCLUSÕES

As manifestações clínicas e laboratoriais observadas no estudo clínico-epidemiológico de pacientes com diagnóstico de SCPH do Estado do Paraná são semelhantes aos casos relatados em outras regiões do Brasil, não tendo sido observado manifestações hemorrágicas, miosite ou alterações renais conforme descrito em casos relacionados a alguns genótipos específicos de hantavírus.

A análise das seqüências genéticas do segmento S do genoma viral, detectado a partir de amostras de pacientes com SCPH em diferentes áreas do Estado do Paraná e com distintas evoluções clínicas, demonstrou uma alta similaridade nucleotídica e de aminoácidos, sugerindo que apenas um genótipo de hantavírus seria responsável por esta clínica nesta região.

A análise filogenética baseada no segmento S, realizada neste estudo, demonstrou que as amostras humanas do Paraná agrupavam-se com as amostras de hantavírus genótipos ITA 37 e 38, detectados em amostra de roedores *Oligoryzomys nigripes* o que permitiu supor que este seria o provável roedor-reservatório deste vírus.

A utilização de oligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir da seqüência genética do vírus encontrado na região aumentou em 50% a positividade da técnica de nRT-PCR.

A padronização do ensaio sorológico utilizando o antígeno recombinante “rNΔ<sub>85</sub>” para detecção dos anticorpos IgM e IgG anti-hantavírus utilizando a metodologia de EIA apresentou altos índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, ao ser testado com amostras de soro humano e de roedor de distintas regiões do Brasil e América do Sul, sugerindo que este poderia ser utilizado para o diagnóstico desta infecção nos diversos laboratórios de saúde pública do Brasil.

O desenvolvimento de testes diagnósticos rápidos e de alta sensibilidade permitirá ampliar estudos de soro prevalência em humanos e roedores de distintas regiões do Brasil, o que seguramente possibilitará maior conhecimento da dinâmica desta doença.

## 5 PERSPECTIVAS

Resultados preliminares da análise de seqüenciamento genético do segmento M do genótipo Araucária demonstram que provavelmente este se classifica como *Juquitiba-like*.

A clonagem e expressão das glicoproteínas G1 e G2 de hantavírus estão sendo realizadas e as proteínas serão incluídas nos kits diagnósticos para aumentar a robustez dos testes.

A caracterização genética completa de um hantavírus brasileiro será realizada com a finalização de seqüenciamento nucleotídico do segmento L.

Obtenção de amostras de RNA viral/vírus provenientes de roedores do Estado do Paraná, para estudos de dinâmica de transmissão e manutenção de hantavírus na natureza. Vigilância epidemiológica.

Finalização do laboratório NB3 nas dependências do IBMP, para o isolamento viral. Estudos de proteção em modelo animal. Padronização de testes de qPCR (PCR quantitativo).

Ampliação da pesquisa de soroprevalência no Estado do Paraná visando à detecção e caracterização de cepas menos virulentas de hantavírus, o que permitirá estudos em modelo animal.

## REFERÊNCIAS

AITICHOU, M. et al. Identification of Dobrava, Hantaan, Seoul, and Puumala viruses by one-step real-time RT-PCR. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v.124, p.21-26, 2005.

AHN, C. et al. Detection of Hantaan and Seoul viruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) in renal syndrome patients with hemorrhagic fever. **Clin. Neph.**, Deisenhofen, v.53, n.2, p.79-89, 2000.

ALPERS, C.; SCHEID, C.; BAUER, G. Acute EBV infection results in IgM responses against unrelated viruses. **Med Microbiol**, Berlin, v.3, p.306-314, 1994.

ANTIC, D.; WRIGHT, K.E.; KANG, C.Y. Maturation of hantavirus protein G1 and G2. **Virology**, New York, v.189, n.1, p.324-328, 1992.

ANTONIADIS, A.; LeDUC, J.W.; DANIEL-ALEXIOU, S. Clinical and epidemiological aspects of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Greece. **Eur. J. Epidemiol.**, Roma, v.3, n.3, p.295-301, 1987.

BHARADWAJ, M. et al. Humoral immune responses in the hantavirus cardiopulmonary syndrome. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.182, p.43-48, 2000.

BIEL, S.S. et al. Quality control measures for the serological diagnosis of hantavirus infections. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v.28, p.248-56, 2003.

BRIESE, T. et al. Batai and Ngari viruses: M segment reassortment and association with severe febrile disease outbreaks in East Africa. **J. Virol.**, Washington, v.80, n.11, p.5627-5630, 2006.

BOHLMAN, M.C. et al. Analysis of hantavirus genetic diversity in Argentina: S segment-derived phylogeny. **J. Virol.**, Washington, v.76, n.8, p.3765-3773, 2002.

BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica. Publicação eletrônica [mensagem pessoal]. Disponível em: <sraboni@ufpr.br>. Acesso em: maio 2006.

CARROL, D.S. et al. Hantavirus pulmonary syndrome in central Bolivia: relationships between reservoir hosts, habitats, and viral genotypes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.72, n.1, p.54-59, 2005.

CASTILLO, C.; NARANJO, J.; OSSA, G. Síndrome cardiopulmonar por hantavirus en 21 adultos en la IX region de Chile. **Rev. Chil. Infectol.**, Santiago, v.17, n.3, p.241-247, 2000.

CHAPMAN, L.E. et al. Discriminators between hantavirus-infected and -uninfected persons enrolled in a trial of intravenous ribavirin for presumptive hantavirus pulmonary syndrome. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.34, n.1, p.293-304, 2002.

CHU, Y.K. et al. The complex ecology of hantaviruses in Paraguay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.69, n.3, p.263-268, 2003.

CLEMENT, J.P. Hantavirus. **Antivir. Res.**, Amsterdam, v.57, p.121-127, 2003.

CURRENT Trends Licensure of Screening Tests for Antibody to Human T-Lymphotropic Virus Type I. **MMWR**, Atlanta, v.37, n.6, p.736-740, 1988. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00051521.htm>>.

DA SILVA, M.V. et al. Hantavirus pulmonary syndrome. Report of the first three cases in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.39, n.4, p.231-234, 1997.

CUSTER, D.M.; THOMPSON, E.; SCHMALJOHN, C.S. Active and passive vaccination against hantavirus pulmonary syndrome with Andes virus M genome segment-based DNA vaccine. **J. Virol.**, Washington, v.77, n.18, p.9894-9905, 2003.

DELFRARO, A. et al. Yellow pygmy rice rat (*Oligoryzomys flavescens*) and hantavirus pulmonary syndrome in Uruguay. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v.9, n.7, p.846-852, 2003.

DOYLE, T.J.; BRYAN, R.T.; PETERS, C.J. Viral hemorrhagic fevers and hantavirus infections in the Americas. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 12, n. 1, p. 95-110, 1998.

DUCHIN, J. et al. Hantavirus pulmonary syndrome: a clinical description of 17 patients with a newly recognized disease. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.330, n.14, p.945-955, 1994.

EARLE, D.P. Symposium on epidemic hemorrhagic fever. **Am. J. Med.**, New York, v.16, p.617-793, 1954.

ELGH, F.; WADELL, G.; JUTO, P. Comparison of the kinetics of Puumala virus specific IgM and IgG antibody response in nephropathia epidemica as measured by a recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay and an immunofluorescence test. **J. Med. Virol.**, New York, v. 45, p. 146-150, 1995.

ELGH, F. et al. A major antigenic domain of the human humoral response to the Puumala virus nucleocapsid protein is located at the amino-terminus. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v.59, p.161-172, 1996.

ELGH, F. et al. Serological diagnosis of hantavirus infections by an enzyme-linked immunosorbent assay based on detection of immunoglobulin G and M response to recombinant nucleocapsid proteins to five viral serotypes. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.35, n.5, p.1122-1130, 1997.

ELKHOURY, M.R. et al. Aspectos epidemiológicos da infecção e patogenicidade por hantavírus no Brasil 2004. **Boletim Epidemiológico Eletrônico**. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 5, n. 3, p. 1-5, 2005. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=21168](http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=21168)>. Acesso em: 15 nov. 2005.

ENGEL, S.R. et al. Molecular systematics and paleobiology of the South American sigmodontine rodents. **Mol. Biol. Evol.**, Chicago, v.15, p.35-49, 1998.

ENRIA, D. et al. Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. Possibility of person to person transmission. **Medicina (B Aires)**, Buenos Aires, v.56, p.709-711, 1996.

- FELDMANN, H. et al. Utilization of autopsy RNA for the synthesis of the nucleocapsid antigen of a newly recognized virus associated with hantavirus pulmonary syndrome. **Virus Res.**, Amsterdam, v.30, p.351-367, 1993.
- FERREIRA, M.S. Hantavíruses. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v.36, n.1, p.81-96, 2003.
- FERRER, J. et al. High prevalence of hantavirus infection in indian communities of the Paraguayan and Argentinean Gran Chaco. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.59, p.438-444, 1998.
- FIGUEIREDO, L.T.M. et al. Hantaviruses in São Paulo state, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v.9, n.7, p.891-892, 2003.
- FLETCHER, R.H., FLETCHER, S.W., WAGNER, S.W. **Epidemiologia Clínica**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1989. p.68-108.
- FRENCH, G.; FOULKE, R.; BRAND, O.; EDDY, G. Korean hemorrhagic fever: propagation of the etiologic agent in a cell line of human origin. **Science**, Washington, v.211, p.1046-1048, 1981.
- FREY, M.T. et al. Hantavirus prevalence in the IX region of Chile. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v.9, n.7, p.827-832, 2003.
- GALENO, H. et al. First human isolate of hantavirus (Andes virus) in the Americas. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v.8, n.7, p.657-660, 2002.
- GAJDUSEK, D. Viral haemorrhagic fever. **J. Pediatr.**, St Louis, v.60, p.841-857, 1962.
- GAVRILOVSKAYA, I.N. et al.  $\beta$ 3-integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.95, p.7074-7079, 1998.
- GAVRILOVSKAYA, I.N. et al. New York 1 and Sin Nombre viruses are serotypically distinct viruses associated with hantavirus pulmonary syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.1, p.122-126, 1999.
- GLASS, G.E. et al. Black Creek Canal virus infection in Sigmodon hispidus in southern Florida. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.59, p.699-703, 1998.
- GONZALES, L.M. et al. Prevalence of antibodies to Sin Nombre virus in humans living in rural areas of southern New Mexico and Western Texas. **Virus Res.**, Amsterdam, v.74, p.177-199, 2001.
- HANTAVIRUS infection – Southwestern United States: Interim recommendations for risk reduction. **MMWR**, Atlanta, v.42, n.RR11, p.1-13, 1993.
- HART, C.A.; BENNETT, M. Hantavirus infections: epidemiology and pathogenesis. **Microbes Infect.**, Paris, v.1, n.14, p.1229-1237, 1999.
- HENDERSON, W.W. et al. Naturally occurring Sin Nombre virus genetic reassortants. **Virology**, New York, v.214, p.602-610, 1995.

HEWLETT, M.J.; PETTERSSON, F. BALTIMORE, D. Circular forms of Uukuniemi virion RNA: an electron microscopic study. **J. Virol.**, Washington, v.21, n.3, p.1086-1093, 1977.

HINDRICHSEN, S. et al. Hantavirus infection in Brazilian patients from Recife with suspect leptospirosis. **Lancet**, Londres, v.341, n.8836, p.50, 1993.

HJELLE, B. et al. Detection of Muerto Canyon virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from patients with hantavirus pulmonary syndrome. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.170, p.1013-1017, 1994a.

HJELLE, B. et al. A novel hantavirus associated with an outbreak of fatal respiratory disease in the Southwestern United States: evolutionary relationships to known hantaviruses. **J. Virol.**, Washington, v.68, n.2, p.592-596, 1994b.

HJELLE, B. et al. Molecular linkage of hantavirus pulmonary syndrome to the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*: genetic characterization of the M genome of New York virus. **J. Virol.**, Washington, v.69, n.12, p.8137-8241, 1995.

HJELLE, B. et al. Hantavirus pulmonary syndrome, renal insufficiency and myositis associated with infection by Bayou hantavirus. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.23, p.495-500, 1996.

HJELLE, B. et al. Rapid and specific detection of Sin Nombre virus antibodies in patients with hantavirus pulmonary syndrome by a strip immunoblot assay suitable for field diagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.35, n.3, p.600-608, 1997.

HJELLE, B.; GLASS, G.E. Outbreak of hantavirus infection in the Four Corners region of the United States in the wake of the 1997-1998 El Nino-southern oscillation. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.181, p.1569-1573, 2000.

HOLMES, R. et al. Seroprevalence of human hantavirus infection in the Ribeirão Preto region of São Paulo state, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v.6, n.5, p.560-561, 2000.

HOOPER, J.W.; CUSTER, D.; THOMPSON, E. DNA vaccination with the Hantaan virus M genes protects hamsters against three of four HFRS hantaviruses and elicits a high-titer neutralizing antibody response in rhesus monkeys. **J. Virol.**, Washington, v.75, n.18, p.8469-8477, 2001.

HOOPER, J.W. et al. Hantaan/Andes virus DNA vaccine elicits a broadly cross-reactive neutralizing antibody response in nonhuman primates. **Virology**, New York, v.347, p.208-216, 2006.

HUANG, C. et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome: relationship between pathogenesis and cellular immunity. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.169, p.868-870, 1994.

HUJAKKA, H. et al. New immunochromatographic rapid test for diagnosis of acute Puumala virus infection. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.39, n.6, p.2146-2150, 2001.

IVERSSON, L.B. et al. Infecção humana por hantavirus nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Rev. Ass. Med. Bras.**, São Paulo, v.40, n.2, p.85-92, 1994.



JENISON, S. et al. Characterization of human antibody responses to Four Corners hantavirus infections among patients with hantavirus pulmonary syndrome. **J. Virol.**, Washington, v.68, n.5, p.3000-3006, 1994.

JENISON, S. et al. Hantavirus pulmonary syndrome: clinical, diagnostic and virologic aspects. **Semin. Resp. Infect.**, Philadelphia, v.10, p.259-269, 1995.

JOHNSON, D.M.; ELLIOT, L.H.; HEYMANN, D.L. Preparation of polyvalent viral immunofluorescent intracellular antigen and use in human serosurveys. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.14, n.5, p.527-529, 1981.

JOHNSON, A.M. et al. Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. **Virology**, New York, v.238, p.115-127, 1997.

JOHNSON, A.M. et al. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. **J. Med. Virol.**, New York, v.59, p.527-535, 1999.

KALLIO-KOKKO, H. et al. Puumala virus antibody and immunoglobulin G avidity assays based on a recombinant nucleocapsid antigen. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.31, n.3, p.677-680, 1993.

KALLIO-KOKKO, H. et al. Evaluation of Puumala virus IgG and IgM immunoassay based on recombinant baculovirus-expressed nucleocapsid protein for early nephropathia epidemica diagnosis. **Clin. Diagn. Virol.**, Amsterdam, v.10, p.83-90, 1998.

KETAI, L.H. et al. Hantavirus pulmonary syndrome: radiographic findings in 16 patients. **Radiology**, Easton, v.191, p.665-668, 1994.

KIM, G.R.; McKEE, Jr., K.T. Pathogenesis of Hantaan virus infection in suckling mice: clinical, virologic and serologic observations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.34, p.388-395, 1985.

KLEMPA, B. et al. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v.12, n.5, p.838-840, 2006.

KLINGSTROM, J.; PLYUSNIN, A.; VAHERI, A. Wild-type Puumala hantavirus infection induces cytokines, C-reactive proteins, and nitric oxide in cynomolgus macaques. **J. Virol.**, Washington, v.76, n.1, p.444-449, 2002.

KUKKONEN, S.K.J.; VAHERI, A.; PLYUSNIN, A. Completion of the Tula hantavirus genome sequence: properties of the L segment and the heterogeneity in the 3' termini of the S and L genome RNAs. **J. Gen. Virol.**, Londres, v.79, p.2615-2622, 1998.

LABORATORY management of agents associated with hantavirus pulmonary syndrome: interim biosafety guidelines reduction. **MMWR**, Atlanta, v.43, n.RR7, p.1-7, 1994.

LAMBRECHT, B.N.; PRINS, J.B.; HOOGSTEDEN, H.C. Lung dendritic cells and host immunity to infection. **Eur. Respir. J.**, Copenhagen, v.18, p.692-704, 2001.

LEDNICKY, J.A.; Hantaviruses: a short review. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v.127, p.30-35, 2003.

LEE, H.; LEE, P.; JOHNSON, K. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.137, n.3, p.298-308, 1978.

LEE, H.W. et al. Observations on natural and laboratory infection of rodents with the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.30, p.477-482, 1981.

LEE, P.W. et al. Serotype classification of hantaviruses by indirect immunofluorescence antibody and plaque reduction neutralization test. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.22, n.6, p.940-944, 1985.

LEE, H.W.; AN, C.N.; SONG, J.W. Field trial of an inactivated vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome. **Arch. Virol.**, Viena, Suppl 1, p.35-47, 1990.

LEE, J.S. Clinical features of hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. **Kidney Int.**, New York, v.40, Suppl. 35, p.S88-S93, 1991.

LEE, H.W.; VAN DER GROEN, G. Hemorrhagic fever with renal syndrome, **Prog. Med. Virol.**, Basel, v. 36; 62-102, 1989.

LeDUC, J.W. et al. Isolation of a Hantaan-related virus from Brazilian rats and serological evidence of its widespread distribution in South America. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.34, n.4, p.810-815, 1985.

LeDUC, J.W. Epidemiology of hantaan and related viruses. **Lab. Anim. Sci.**, Joliet, v.37, n.4, p.413-418, 1987.

LEVIS, S. et al. New hantaviruses causing pulmonary syndrome in central Argentina. **Lancet**, Londres, v.349, n.5, p.998-999, 1997.

LEVIS, S. et al. Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.177, p.529-538, 1998.

LI, D. et al. Complete nucleotide sequence of the M and S segments of two hantavirus isolates from California: evidence for reassortment in nature among viruses related to hantavirus pulmonary syndrome. **Virology**, New York, v.206, p.973-983, 1995.

LOEBER, C. et al. The Hantaan virus glycoprotein precursor is cleaved at the conserved pentapeptide WAASA. **Virology**, New York, v.289, p.224-229, 2001.

LÓPEZ, N. et al. Genetic characterization and phylogeny of Andes virus and variants from Argentina and Chile. **Virus Res.**, Amsterdam, v.50, p.77-84, 1997.

LUNDKVIST, A.; SCHOLANDER, C.; NIKLASSON, B. Anti-idiotypic antibodies against Puumala virus glycoprotein-specific monoclonal antibodies inhibit virus infection in cell culture. **Arch. Virol.**, Viena, v.132, n.3, p.255-265, 1993.

MACKOW, E.R.; GAVRILOVSKAYA, I.N. Cellular receptors and hantavirus pathogenesis. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, Berlim, v.256, p.91-115, 2001.

MARTINEZ, P. et al. Person-to-person transmission of Andes virus. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v.11, n.12, p.1848-1853, 2005.

- McELROY, A.K. et al. Andes virus M genome segment is not sufficient to confer the virulence associated with Andes virus in Syrian hamsters. **Virology**, New York, v.326, p.130-139, 2004.
- MENDES, W.S. et al. Hantavirus infection in Anajatuba, Maranhão, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v.10, n.8, p.1496-1498, 2004.
- MER, M.; RICHARDS, G. Corticosteroids in life-threatening varicella pneumonia. **Chest**, Park Ridge, v.114, p.426-431, 1998.
- MEYER, B.J.; SCHMALJOHN, C.S. Persistent hantavirus infections: characteristics and mechanisms. **Trends microbial.**, Cambridge, v.8, n.2, p.61-67, 2000.
- MILAZZO, M.L. et al. Maporal viral infection in the Syrian golden hamster: a model of hantavirus pulmonary syndrome. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.186, p.1390-1395, 2002.
- MONROE, M.C. et al. Genetic diversity of *Peromyscus*-borne hantaviruses in North America. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v.5, n.1, p.75-86, 1999.
- MOOLENAAR, R.L. et al. Clinical features that differentiated hantavirus pulmonary syndrome from three other acute respiratory illness. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.21, p.643-649, 1995.
- MORI, M. et al. High levels of cytokine-producing cells in the lung tissues of patients with fatal hantavirus pulmonary syndrome. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.179, p.295-302, 1999.
- MORZUNOV, S.P. et al. Genetic analysis of the diversity and origin of hantaviruses in *Peromyscus leucopus* mice in North America. **J. Virol.**, Washington, v.72, n.1, p.57-64, 1998.
- MUSTONEN, J. et al. Genetic susceptibility to severe course of nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus. **Kidney Int.**, New York, v.49, n.1, p.217-221, 1996.
- NEMIROV, K. et al. Adaptation of Puumala hantavirus to cell culture is associated with point mutations in the coding region of the L segment and in the noncoding regions of the S segment. **J. Virol.**, Washington, v.77, n.16, p.8793-8800, 2003.
- NICHOL, S.T. et al. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. **Science**, Washington, v.262, n.5, p.914-917, 1993.
- NICHOL, S.T. Bunyaviruses. In: KNIPE, A.M.; HOWLEY, P.M. **Field's Virology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. v.2. p.1603-1633. 1. CD ROOM.
- NOLTE, K.B. et al. Hantavirus pulmonary syndrome in the United States: a pathological description of a disease caused by a new agent. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v.26, n.1, p.110-120, 1995.
- NORDSTRÖM, H. et al. Microarray technology for identification and distinction of hantaviruses. **J. Med. Virol.**, New York, v.72, p.646-655, 2004.
- PADULA, P. et al. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. **Virology**, New York, v.241, p.323-330, 1998.

PADULA, et al. Genetic diversity, distribution, and serological features of hantavirus infection in five countries in south America. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.38, n.8, p.3029-3035, 2000a.

PADULA, P. et al. Development and evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein. **J. Medical Microbiol.**, Edinburgh, v.49, p.149-255, 2000b.

PADULA, P. et al. Complete nucleotide sequence of the M RNA segment of Andes virus and analysis of the variability of the termini of the virus S, M and L segments. **J. Gen. Virol.**, Londres, v.83, n.9, p.2117-2124, 2004a.

PADULA, P. et al. Transmission study of Andes hantavirus infection in wild sigmodontine rodents. **J. Virol.**, Washington, v.78, n.21, p.11972-11979, 2004b.

PEEBLES, R.S., Jr.; GRAHAM, B.S. Viruses, dendritic cells and the lung. **Respir. Res.**, Londres, v.2, n.4, p.245-249, 2001.

PENSIERO, M.N. et al. Hantaan virus infection of human endothelial cells. **J. Virol.**, Washington, v.66, n.10, p.5929-5936, 1992.

PETERS, C.J.; SIMPSON, G.L.; LEVY, H. Spectrum of hantavirus infection: hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. **Ann. Rev. Med.**, Palo Alto, v.50, p.531-545, 1999.

PETERS, C.J.; KHAN, A.S. Hantavirus pulmonary syndrome: the new American hemorrhagic fever. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.34, p.1224-1231, 2002.

PLYUSNUN, A.; VAPALAHTI, O.; VAHERI, A. Hantavirus: genome structure, expression and evolution. **J. Gen. Virol.**, Londres, v.77, p.2677-2687, 1996.

PLYUSNIN, A.; MORZUNOV, S.P. Evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, Berlim, v.256, p.47-75, 2000.

PLYUSNIN, A. Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. **Arch. Virol.**, Viena, v.147, p.665-682, 2002.

RABONI, S.M. et al. Clinical survey of hantavirus in southern Brazil and the development of specific molecular diagnosis tools. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.72, p.800-804, 2005a.

RABONI, S.M. et al. Hantaviruses in Central South America: phylogenetic analysis of the S segment from HPS cases in Paraná, Brazil. **J. Med. Virol.**, New York, v.76, n.4, p.553-562, 2005b.

RABONI, S.M. et al. Hantavirus Infection in Brazil: Improvement of Detection by the Development and Evaluation of an Enzyme Immunoassay and Immunoblotting Based on Recombinant Protein. **Submetido em março 2006.**

RAFTERY, M.J.; KRAUS, A.A.; ULRICH, R. Hantavirus infection of dendritic cells. **J. Virol.**, Washington, v.76, n.21, p.10724-10733, 2002.

RAVKOV, E.V. et al. Genetic and serological analysis of Black Creek Canal virus and its association with human disease and *Sigmodon hispidus* infection. **Virology**, New York, v.210, p.482-489, 1995.

RIQUELME, R. et al. Hantavirus pulmonary syndrome, southern Chile. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v.9, n.11, p.1438-1443, 2003.

RIZVANOV, A.A. et al. Generation of a recombinant cytomegalovirus for expression of a hantavirus glycoprotein. **J. Virol.**, Washington, v.77, n.22, p.12203-12210, 2003.

ROSA, E.S.T. et al. Newly recognized hantaviruses associated with hantavirus pulmonary syndrome: partial genetic characterization of viruses and serologic implications of likely reservoirs. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, New Rochelle, v.5, n.1, p.11-19, 2005.

SCHMALJOHN, C.S. et al. Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. **Science**, Washington, v.227, n.1, p.1041-1044, 1985.

SCHMALJOHN, C.S.; PATTERSON, J.L. Bunyaviridae and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. **Fundamental Virology**. 2.ed. New York: Raven Press, 1991. p.545-566.

SCHMALJOHN, C.S.; HJELLE, B. Hantaviruses: a global disease problem. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v.3, n.2, p.95-104, 1997.

SCHMIDT, J. et al. Development and evaluation of serological assays for detection of human hantavirus infections caused by Sin Nombre virus. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v.33, p.247-253, 2005.

SCHUBERT, J.; TOLLMANN, F.; WEISSBRICH, B. Evaluation of a pan-reactive hantavirus enzyme immunoassay and of a hantavirus immunoblot for the diagnosis of nephropathia epidemica. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v.21, p.63-74, 2001.

SEIJO, A. et al. Estudio de hantavirus Seoul en una poblacion humana y de roedores en un asentamiento precario de la ciudad de Buenos Aires. **Medicina (Buenos Aires)**, Buenos Aires, v.63, p.193-196, 2003.

SIMONSEN, L. et al. Evaluation of the magnitude of the 1993 hantavirus outbreak in the southwestern United States. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.172, p.729-733, 1995.

SJÖLANDER, K.B. et al. Evaluation of serological methods for diagnosis of Puumala hantavirus infection (nephropathia epidemica). **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.35, n.12, p.3264-3268, 1997.

SMADEL, J. Epidemic hemorrhagic fevers. **Am. J. Public Health**, Washington, v.43, p.1327-1330, 1953.

SUNDSTROM, J.B. et al. Hantavirus infection induces the expression of RANTES and IP-10 without causing increased permeability in human lung microvascular endothelial cells. **J. Virol.**, Washington, v.75, n.13, p.6070-6085, 2001.

SUZUKI, A. et al. Identifying rodent hantaviruses reservoirs, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v.10, n.12, p.2127-2134, 2004.

- TAPIA, M.; MANSILLA, C.; VERA, J. Síndrome pulmonar por hantavirus: experiencia clínica en diagnóstico y tratamiento. Hospital Coyhaique-Chile. **Rev. Chil. Infectol.**, Santiago, v.17, n.3, p.258-269, 2000.
- TERAJIMA, M. et al. High levels of viremia in patients with the hantavirus pulmonary syndrome. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.180, p.2030-2034, 1998.
- TERAJIMA, M. et al. Immune responses to Puumala virus infection and the pathogenesis of nephropathia epidemica. **Microbes Infect.**, Paris, v.6, p.238-245, 2004.
- TISCHLER, N.D. et al. Complete sequence of the genome of the human isolate of Andes virus CHI-7913: comparative sequence and protein structure analysis. **Biol. Res.**, Santiago, v.36, p.201-210, 2003.
- TORO, J. et al. An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome, Chile, 1997. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v.4, n.4, p.687-694, 1998.
- VAPALAHTI, O. et al. Antigenic properties and diagnostic potential of Puumala virus nucleocapsid protein expressed in insect cells. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.34, n.1, p.119-125, 1996.
- VASCONCELOS, P.F.C. et al. Evidence of circulating hantaviruses in Brazilian Amazônia through high prevalence of antibodies in residents of Manaus, Brazil. **Ciênc. Cult.**, São Paulo, v.44, p.162-163, 1992.
- VASCONCELOS, M.I. et al. Hantavírus pulmonary syndrome in the rural area of Juquitiba, São Paulo metropolitan area, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.39, n.4, p.237-238, 1997.
- VERITY, R. et al. Hantavirus pulmonary syndrome in northern Alberta, Canada: clinical and laboratory findings for 19 cases. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.31, p.942-946, 2000.
- VICENT, M.J. et al. Hantavirus pulmonary syndrome in Panama: identification of novel hantaviruses and their likely reservoirs. **Virology**, New York, v.277, p.14-19, 2000.
- VITEK, C.R. et al. Evidence against infection with hantaviruses among forest and park workers in the southwestern United States. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.23, p.283-285, 1996.
- WELLS, R.M. et al. An unusual outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? Hantavirus pulmonary syndrome study group for Patagonia. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v.3, n.2, p.171-174, 1997.
- WHITE, D.O.; FENNER, F.J. **Medical Virology**. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1994.
- WILLIAMS, R. et al. An outbreak of pulmonary hantavirus syndrome in western Paraguay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.57, n.3, p.274-282, 1997.
- WILSON, W.J. et al. Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology. **Mol. Cell. Probes**, Londres, v.16, p.119-127, 2002.

YOSHIMATSU, K. et al. Western blotting using recombinant Hantaan virus nucleocapsid protein expressed in silkworm as a serological confirmation of hantavirus infection in human sera. **J. Vet. Med. Sci.**, Toquio, v.58, p.71-74, 1996.

YOUNG, J.C. et al. The incubation period of hantavirus pulmonary syndrome, **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.62, p.714-717, 2000.

YU, S. et al. Maternally derived recombinant human anti-hantavirus monoclonal antibodies are transferred to mouse offspring during lactation and neutralize virus *in vitro*. **J. Virol.**, Washington, v.80, n.8, p.4183-4186, 2006.

ZAKI, S.R. et al. Hantavirus pulmonary syndrome: pathogenesis of an emerging infectious disease. **Am. J. Pathol.**, New York, v.146, n.3, p.552-579, 1995.

ZÖLLER, L. et al. Immunoblot analysis of the serological response in hantavirus infections. **J. Med. Virol.**, New York, v.27, p.231-237, 1989.

ZÖLLER, L. et al. A novel  $\mu$ -capture enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant proteins for sensitive and specific diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.31, n.5, p.1194-1199, 1993.